Virologie VIH-1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I – GENERALITES SUR LE VIH-1

A – Le Syndrome de l'Immunodéficience Humaine Acquise ou SIDA : une pandémie mondiale.

1) Historique

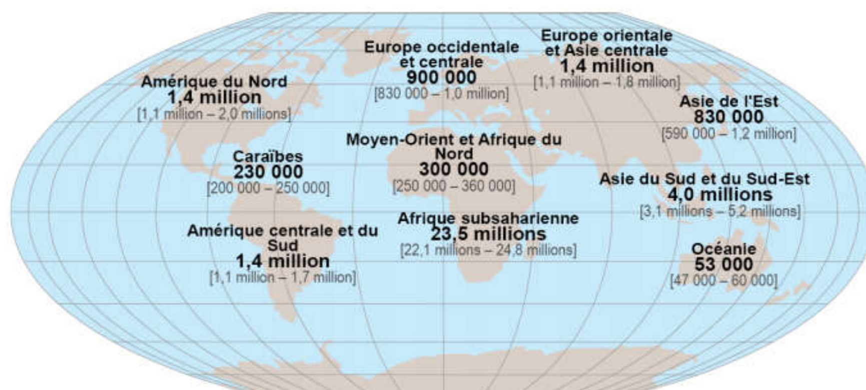
En Juin 1981 aux Etats-Unis sont rapportés les premiers cas de patients atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), suite à l'observation d'une recrudescence d'infections opportunistes, principalement pneumocystoses et sarcome de Kaposi, survenant habituellement chez des individus fortement immunodéprimés. En effet, le SIDA se caractérise par une défaillance du système immunitaire favorisant le développement de maladies opportunistes. Ce fléau a pour agent causal le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), qui s'est rapidement propagé jusqu'aux régions les plus éloignées du globe en entrainant un nombre croissant de contaminations et de décès.

En 1983, une équipe de l'Institut Pasteur de Paris constituée de Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier (tous deux prix Nobel de Médecine en 2008) isole le virus. Depuis, la communauté scientifique se mobilise pour mettre en place un nombre important de programmes de recherche pour lutter contre cette maladie. Cependant, malgré des progrès scientifiques considérables dans des domaines tels que le diagnostic, les connaissances fondamentales sur le virus, ou encore le développement de traitements antirétroviraux hautement actifs (HAART, « *Highly Active Antiretroviral Therapy* »), le VIH-1 continue à se disséminer et l'épidémie reste très importante.

2) Epidémiologie

Selon les dernières estimations de l'ONU/SIDA/OMS parues en Novembre 2012, plus de 34 millions de personnes à travers le monde vivaient avec le VIH en 2011, parmi lesquelles 8 millions sont sous traitements antiviraux, et 14,8 millions restent éligibles à ces traitements Pour la même année, on estime le nombre de nouveaux cas à 2,5 millions, soit 700 000 cas de moins qu'en 2001.
A l'échelle régionale, l'Afrique sub-saharienne reste la zone géographique à la plus forte incidence avec 23,5 millions de personnes séropositives (Fig. 1A). Cependant, au cours de ces 6 dernières années, l'Afrique a réduit d'un tiers le nombre de décès dus au SIDA. En effet, des investissements soutenus et des actions politiques renforcées ont permis de réduire de 25 à 50% le taux de nouvelles infections au VIH dans plus de 25 pays, dont plus de la moitié se trouvent en Afrique. En Asie et Océanie, d'autres pays ont enregistrés des baisses radicales du nombre de nouvelles infections (Népal 91%, Cambodge 88%) et 14 autres pays de la région voient ce nombre diminué de plus de 50%.
Malgré ces diminutions importantes dans la plupart des pays du monde, l'ONUSIDA dénombre 1,7 million de décès en 2011 (Fig. 1B), soit 24% de moins qu'en 2005, année où le nombre de décès avait atteint un pic critique.

A



B

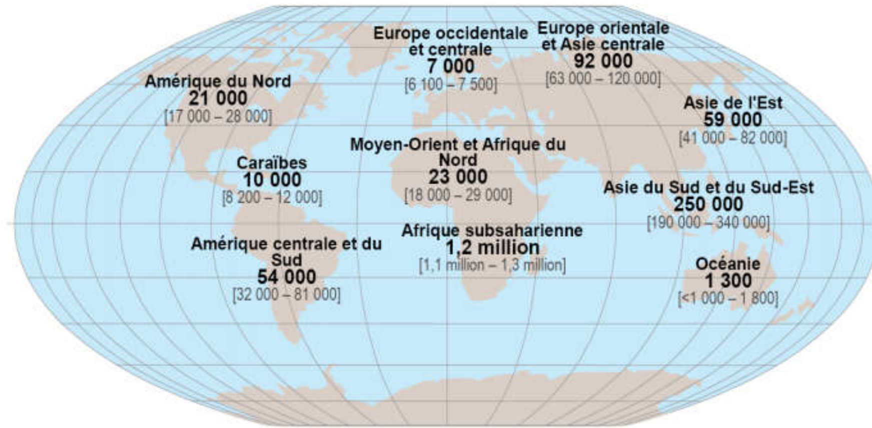


Figure1. A : Estimation du nombre d'enfants et d'adultes vivant avec le VIH en 2011. B : Estimation du nombre de décès d'enfants et d'adultes liés au SIDA en 2011.

3) Origine du VIH-1

L'existence de lentivirus proches génétiquement du VIH-1 chez de nombreuses espèces de primates non humains *(Daniel MD et al., Science, 1985 ; Kanki PJ et al., Science, 1985)* suggère une transmission à l'homme de certains de ces virus qui pourraient être à l'origine du VIH-1. Des analyses phylogénétiques menées sur les séquences du génome du VIH-1 et des virus associés de primates non-humains (**Figure 2)** laissent supposer une transmission inter-espèces de virus de l'immunodéficience simienne (SIV) de singes infectés à l'homme *(Gao F et al., Nature, 1999).*

Des analyses complémentaires ont permis de préciser que le VIH-1 provenait de la transmission à l'homme du SIVcpzPtt, un virus infectant naturellement plusieurs communautés de chimpanzés "*Pan troglodytes troglodytes*" géographiquement isolées au Cameroun *(Gao F et al., Nature, 1999; Korber B et al., Science, 2000).* L'hypothèse d'une transmission sanguine de ce virus du chimpanzé aux chasseurs humains par exposition directe des hommes au sang des animaux contaminés lors de la chasse de primates ou de la consommation de viande de singe contaminée crue a été évoquée, d'autant plus que ces pratiques sont courantes en Afrique. Des travaux récents ont permis de montrer que trois événements de transmission indépendants paraissaient être à l'origine des VIH-1 des groupes M, N et O *(Keele BF et al., Science, 2006)*. Ces travaux ont établi un lien phylogénétique entre les VIH-1 du groupe M et N et des virus infectant des groupes de chimpanzés localisés géographiquement au Cameroun. Par contre, les VIH-1 du groupe O semblent plutôt provenir d'un groupe de gorilles également localisé au Cameroun, infecté par une souche de SIV proche du SIVcpzPtt *(Van Heuverswyn F et al., Nature, 2006)*. Enfin, le VIH-1 de groupe P a récemment été identifié chez une patiente d'origine camerounaise *(Plantier JC et al., Nat Med, 2009)*. D'un point de vue génétique, cette nouvelle forme virale semblerait être très proche d'une souche de SIV identifiée parmi des populations de gorilles d'Afrique centrale (SIVgor).

Figure 2. Représentation des associations phylogénétiques existant entre les différentes souches de SIV et VIH *(Vartanian JP et al., J Gen Virol, 2002)*

4) Transmission

Il existe trois modes de transmission du VIH, responsable de l'importante dissémination du virus et qui sont i) la transmission par voie sexuelle, ii) la transmission par voie sanguine et iii) la transmission materno-fœtale.

a. La transmission sexuelle.

Quatre-vingt pour cent des infections dans le monde se font lors de rapports sexuels non protégés, hétérosexuels pour 70% d'entre eux, et homosexuels entre hommes pour 5 à 10%. La transmission sexuelle de l'infection à VIH se fait par les muqueuses (vagin, pénis, rectum ou de la bouche), en contact avec des sécrétions sexuelles ou du sang contenant le virus. Le risque de transmission dépend du type de relation sexuelle mais aussi de la quantité de virus présent dans le sperme ou les sécrétions vaginales. Dans le sperme, le VIH est présent d'une part sous forme de particules virales libres au sein du liquide séminale, et d'autre part sous forme d'ADN proviral intégré dans les cellules infectées. La charge virale des sécrétions génitales suit globalement la charge virale plasmatique. Certains facteurs augmentant le risque de transmission sexuelle ont été bien identifiés. La primo-infection et le stade SIDA sont les périodes ou l'infectiosité est la plus élevée, du fait de la forte virémie. Plusieurs études ont démontré le rôle facilitant, pour la transmission du VIH, de maladies ou de pratiques sexuelles qui occasionnent des érosions de la muqueuse génitale (herpès, syphilis, chancre mou) et d'autres agents pathogènes tels que le gonocoque, les Chlamydia ou les bactéries responsables des vaginites (mycoplasmes, *Gardnerella vaginalis*). En outre, il a été démontré chez des sujets infectés par le VIH-1 que les urétrites masculines s'accompagnent d'une augmentation de la charge virale dans le sperme. L'ensemble de ces constatations justifie un renforcement du dépistage et du traitement systématique de toutes maladies sexuellement transmissibles (MST), comme de leur prévention par l'information et l'éducation sexuelle, pour lutter contre la pandémie du VIH.

b. La transmission par voie sanguine

Ce mode de transmission concerne majoritairement trois sous-ensembles de la population qui sont i) les usagers de drogues par intraveineuses, ii) les hémophiles et iii) les autres malades ayant reçus une transfusion de sang ou des dérivés sanguins.

Chez les usagers de drogues par intraveineuses, les contaminations proviennent de l'échanges de seringues usagées potentiellement infectées par le VIH, mais également par d'autres virus tels que les virus de l'hépatite B et C (VHC et VHB). En France, 20% des toxicomanes sont infectés par VIH et 70% le sont par VHC. Depuis peu, certains gouvernements ont mis en place des centres spéciaux dédiés au « *shoot* » des personnes faisant l'usage de ces drogues, ou sont mis à disposition des seringues neuves afin de limiter la réutilisation de seringues usagées.

Les infections à VIH des hémophiles et des transfusés a été la conséquence de l'utilisation de facteurs de coagulation et de sang contaminés administrés dans les années 1980. Depuis le 1er Aout 1985 est mis en place un dépistage systématique pour tout don de sang, ce qui a considérablement réduit le risque de contamination par cette voie. Malheureusement, l'hétérogénéité des modes de dépistages d'un pays à l'autre fait que subsiste encore un grand nombre de contamination par voie sanguine.

Plus rares, les accidents ayant entrainé une contamination professionnelle par le VIH ont été principalement provoqués par des blessures ou des piqures avec du matériel contaminé. Une étude cas-témoin a confirmé que le risque de transmission était directement lié à la profondeur de la blessure et au stade de l'infection chez le patient source. Elle a également démontré le bénéfice d'une prophylaxie anti-VIH. En France, et dans de nombreux pays, des recommandations ont été prises en matière de prophylaxie par bi- ou trithérapie antirétrovirale, après exposition au VIH.

c. La transmission materno-fœtale

Dans les pays industrialisés le taux de transmission materno-fœtale reste stable et s'établi entre 15 et 25%. Un passage précoce du virus, correspondant à une transmission au cours des 1er et 2nd trimestres de grossesse semble pouvoir s'effectuer mais reste cependant un évènement rare. Les passages tardifs trans-placentaires semblent les plus fréquents, dont 2/3 ont lieu le jour de l'accouchement, par le biais d'échanges sanguins maternel et fœtal juste avant ou pendant le travail. A côté de la transmission placentaire, le VIH peut être transmis lors de l'allaitement du fœtus par la mère. Certains facteurs interviennent de façon claire sur la transmission périnatale du VIH. Il a été montré que le risque de transmission est inversement proportionnel au taux de lymphocytes T CD4+ chez la mère. Il en est de même qu'une charge virale sanguine élevée chez la mère augmente le risque de contamination. *(Warszawski J et al., AIDS, 2008)*

5) Immunopathologie de l'infection à VIH-1

L'immunopathologie du VIH-1 se caractérise par trois phases distinctes (**Figure 3)** correspondant à i) la primo-infection (ou phase aigüe), ii) la phase chronique (ou asymptomatique) et iii) le stade SIDA (symptomatique).

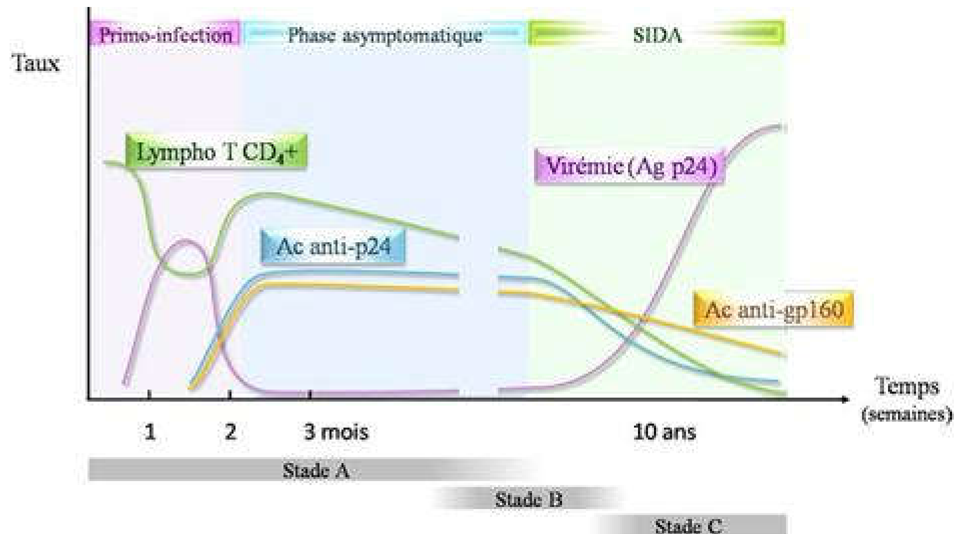


Figure 3. **Différentes phases de l'immunopathologie liée au VIH**. L'infection primaire est généralement associée à des symptômes cliniques du syndrome rétroviral aigu. Après les premiers mois suivant l'infection, la virémie plasmatique se stabilise et le nombre de cellules T CD4+ se normalise. La phase chronique prolongée est cliniquement silencieuse, malgré la réplication virale permanente à des niveaux élevés. Le SIDA est caractérisé par la survenue d'infections opportunistes ou de tumeurs malignes associées au VIH-1. Le risque des maladies opportunistes augmente, de façon significative, lorsque le nombre des cellules T CD4+ tombe sous les 200 cellules/mm3. La diversité virale augmente en conformité avec le niveau toujours élevé de la réplication virale et de la nature d'erreurs de la transcription inverse. *(Delfraissy JF, Rev Prat, 1999)*

a. La phase de primo-infection

Elle survient environ 2 à 8 semaines après la contamination. Cette phase reste symptomatique pour la majeure partie des cas (50-75%) avec l'apparition de fièvres, d'adénopathies, myalgies… Elle se caractérise par une importante réplication virale accompagnée d'une chute rapide et importante du nombre de lymphocytes T CD4+ malgré l'induction d'une réponse immune par le virus *(Musey L et al., N Engl J Med, 1997)*. Il existe une corrélation directe entre le nombre de lymphocytes T CD4+ et la charge virale au cours de cette phase, et sont des indicateurs du pronostic de l'évolution de la maladie *(Mellors JW et al., Science, 1996)*. Des réactions immunitaires de type sécrétion d'anticorps se mettent en place, définissant la séroconversion de l'individu et sont utilisées dans les tests de routine de dépistage par ELISA de la protéine de capside CAp24 et western-blot.

b. La phase chronique

En l'absence de traitement antirétroviral, la phase asymptomatique dure une dizaine d'années. La charge virale reste faible et le nombre de lymphocytes T CD4+ diminue lentement. Les cellules cibles du virus constituent une partie du réservoir viral : le virus reste latent dans ces cellules. Le virus se réplique essentiellement dans les lymphocytes T CD4+ du tractus digestif *(Veazey RS et al., Science, 1998)* et des tissus lymphoïdes

(Pantaleo G et al., Nature, 1993). De fortes lésions cellulaires se font dans ces organes, entrainant le remplacement des tissus lésés par des fibres de collagènes. Les lymphocytes T mémoires CD4+ CCR5+ sont les premiers à disparaitre, suivi des autres lymphocytes T CD4+ lors du changement de tropisme du virus *(Veazey RS et Lackner AA, J Exp Med, 2004)*. Lorsque les mécanismes de renouvellement des lymphocytes T CD4+ sont dépassés, on observe une recrudescence du titre viral plasmatique.

c. Le stade SIDA

La diminution systématique des lymphocytes T CD4+ conduit à l'incapacité du système immunitaire à lutter contre les maladies opportunistes, et conduit à une augmentation très importante de la virémie. Lorsque le taux de lymphocytes T CD4+ passe sous le seuil des 200 cellules/mm^3, les premières maladies opportunistes apparaissent dont les plus communes sont les pneumonies à *Pneumocystis carinii*, le syndrome de Kaposi et la tuberculose. En l'absence de traitements appropriés, la personne décède du SIDA.

6) Pathogénèse

L'infection se caractérise par une réplication intense et soutenue, principalement dans les tissus lymphoïdes, d'un virus hautement variable et capable de s'adapter à la pression de l'environnement dans lequel il évolue. Les mécanismes de destruction des lymphocytes T CD4+ ne sont pas encore clairs mais cette destruction cellulaire peut être due à i) la lyse directe des cellules infectées par les effets cytotoxiques du virus, ii) la lyse des lymphocytes T CD4+ par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, iii) les phénomènes d'apoptose ou encore iv) l'hyperstimulation des lymphocytes T CD4+ conduisant à l'anergie cellulaire.

L'évolution de la virémie et de la réponse immunitaire n'est pas la même entre individus infectés. En effet, on estime à environ 5% le nombre de personnes infectées ayant une évolution lente : les « non progresseurs » ou « progresseurs à long terme ». La virémie chez ces personnes reste faible dans la circulation périphérique et au niveau des organes lymphoïdes, et préserve un nombre de lymphocytes T CD4+ relativement stable. De plus, leur réponse immune spécifique à médiation cellulaire (lymphocytes T CD8+…) reste relativement bonne. A l'opposé, il existe entre 5 et 10% de personnes présentant des facteurs de risques de progression de la maladie : les « progresseurs rapides ». Il est possible que ces différents modes d'évolution de la maladie soient dus à la complexité des interactions protéines virales et protéines cellulaires intrinsèques à chaque individu. Les facteurs génétiques et immunologiques de l'hôte, certains haplotypes HLA de classe I, certaines mutations au niveau des gènes codant pour les récepteurs et corécepteurs du virus, la qualité de la réponse cellulaire primaire cytotoxique ou encore la persistance de la réponse spécifique CD4+ sont autant de facteurs cellulaires qui pourraient expliquer ces variations d'évolution de la maladie.

B – Le VIH-1 : structure et réplication

1) Définition et classification

Le VIH-1 est un rétrovirus humain appartenant à la famille des *Retroviridae* et à la sous-famille des lentivirus (**Figure 4**). Les virus de la famille des *Retroviridae* se définissent par leur structure mais surtout par leur mode de réplication. Ces virus à ARN vont pouvoir rétrotranscrire leur génome en ADN grâce à l'enzyme qu'ils transportent : la transcriptase inverse. Ce génome rétrotranscrit en ADN viral pourra alors s'intégrer dans le génome de la cellule cible sous le nom de provirus. Cependant, les lentivirus sont des virus non transformant, à l'origine de maladies chroniques à évolution lente, affectant le système immunitaire. Le VIH-1 possède une variabilité génétique très importante, à l'origine, notamment, de l'émergence des résistances aux antirétroviraux.

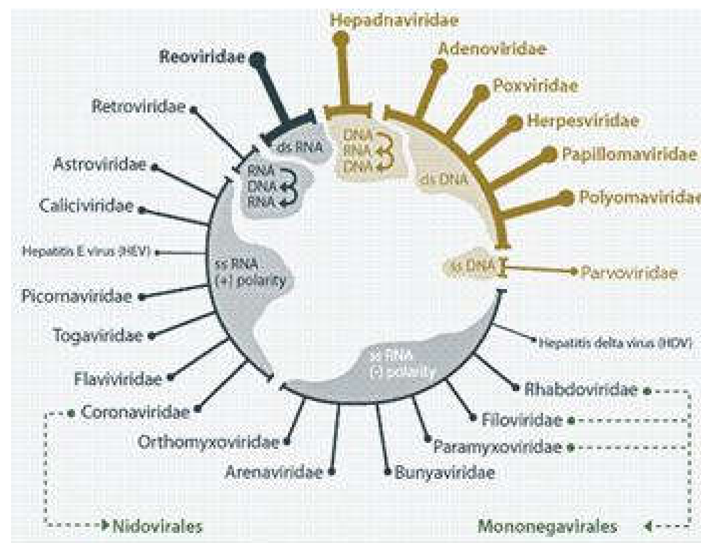


Figure 4: Classification des différentes familles de virus.

2) Structure de la particule virale

Le VIH-1 est un virus enveloppé de 90 à 120nm de diamètre (**Figure 5**). Son enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire *(Aloia R et al, PNAS, 1993)*, dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe virale : la glycoprotéine transmembranaire TMgp41 traversant la bicouche lipidique et formant une liaison faible avec la glycoprotéine d'enveloppe externe, la SUgp120. Ces deux protéines portent les fonctions de reconnaissance et de fusion du virus à la cellule cible. Les virions arborent 14 +/- 7 spicules dans leur membrane, un spicule étant un trimère de SUgp120/TMgp41 *(Chertova E. et al, J Virol, 2002)*.

Le *core* viral comprends deux molécules d'ARN identiques, trois protéines et des enzymes virales : la transcriptase inverse (RT, p66/p51), l'intégrase (IN, p32) et la protéase (PR, p10), issues du clivage enzymatique de la polyprotéine Gag-Pol. La protéine de matrice (MA, p17) ancrée à la membrane interne du virus grâce en partie à la présence d'un acide myristique, forme une structure globulaire à l'intérieur de l'enveloppe.

Le *core* viral est constitué de la protéine interne dite majeure, car la plus abondante, d'un poids moléculaire de 24kDa : la capside (CA, p24). Cette protéine de capside enferme un complexe ribonucléoprotéique nécessaire à la synthèse de l'ADN proviral : l'homodimère d'ARN de polarités positives, recouvert de molécules de nucléocapside (NC, p7), deux molécules d'ARNt^{Lys} nécessaires à la transcription inverse et des molécules de transcriptase inverse. Les molécules d'intégrase, de protéase, ainsi que les protéines virales accessoires Vif, Vpr, Vpu et Nef sont également présentes. Le virus incorpore aussi de nombreuses protéines cellulaires indiquant que le virus VIH-1 interagit fortement avec la machinerie cellulaire *(Cantin R. et al., J Virol, 2007)*.

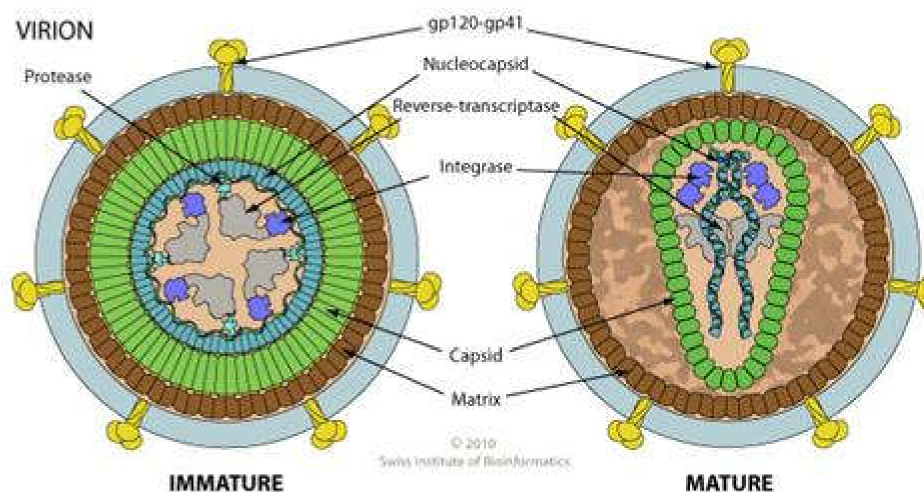


Figure 5 : Représentation schématique d'une particule VIH-1 immature (gauche) et mature (droite) Les différentes protéines qui composent le virus ainsi que l'ARN génomique sont schématisées. Les protéines cellulaires incorporées ne sont pas indiquées. Le nombre de symboles représentants les protéines ne reflète pas la stœchiométrie de ces molécules dans le virion.

3) Organisation génomique

Le génome viral (**Figure 6**) est formé de deux copies d'ARN linéaire simple brin (9.2kb) de polarité positive. Chacun de ces brins est associé à une molécule de transcriptase inverse et à l'intégrase. A l'intérieur des virions, les ARN sont retrouvés sous des formes dimériques, liés par des liaisons non covalentes. Ils présentent une coiffe en 5' et une queue polyadénylée en 3'. *(Levin JG et al., Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2005)*.

Une simple molécule d'ARN contient des structures internes fondamentales à la réplication virale et à l'échappement à la réponse immune. Ces importantes structures comprennent les sites d'entrés internes aux ribosomes (IRES), les signaux d'empaquetages, les structures mimant les ARNt, les motifs de modification de cadre de lecture des ribosomes (*ribosomes frameshift*), et des éléments de régulation en *cis* *(Cann AJ et al., Virology, 2005 ; Coffin JM et al., Retroviruses, 1997)*. Chez le VIH-1, les structures de l'ARN activent la transcription, initialisent la transcription inverse, facilitent la dimérisation du génome, régulent l'export des ARN nucléaires, servent de signal de polyadénylation et permettent des interactions entre les protéines virales

et protéines cellulaires *(Frankel AD and Young JA, Annu Rev Biochem, 1998 ; Damgaard CK. Et al., J Mol Biol, 2004 ; Goff SP, Nat Rev Microbiol, 2007 ; Wilkinson KA et al, PLoS Biol, 2008)*.
Le génome du VIH-1 contient 9 cadres de lectures ouverts (ORFs) aboutissant à l'encodage de 15 protéines *(Frankel AD and Young JA, Annu Rev Biochem, 1998)*. Le précurseur Pr55Gag est une polyprotéine qui une fois clivée par des enzymes donnera les protéines de MAp17, Cap24, NCp7 et la protéine p6. La polyprotéine Gag-Pol permet l'expression des enzymes PRp10, RTp66/p51, et l'INp32. Le gène *env* code pour un peptide signal de 30 acides aminés, la TMgp41 et la SUgp120.

D'autres séquences additionnelles codent pour des protéines auxiliaires : deux protéines régulatrices nommées Tat et Rev, et 4 protéines accessoires : Vif, Vpr, Vpu et Nef.

La protéine Tat (*Transactivator of transcription*, p16 et p14) est un transactivateur de la transcription et agit au niveau des LTR en se liant directement à la séquence TAR (*Tat response element*). La protéine Rev (*Regulation of expression*, p19) est impliquée dans l'export des ARNs du noyau en liant les séquences RRE des ARN (*Rev response element*).

La protéine Vif (*Virion infectivity factor*) prévient l'action de la protéine APOBEC3G, un facteur de restriction cellulaire qui sera décrit en partie III-C. La protéine Vpr (*Viral protein R*) participe à la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN par la RT *(Stark LA et al., J Virol, 1998)*, Elle joue aussi un rôle important dans la régulation de l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (PIC) *(Heinzinger NK et al., PNAS, 1994)*. De plus, Vpr induit l'arrêt du cycle cellulaire et est nécessaire pour la réplication du virus dans les cellules quiescentes, comme les macrophages *(Lewis PF et Emerman M, J Virol, 1994)*. La protéine Nef (*Negative regulatory factor*, p27) permet une diminution de la protéine CD4 récepteur au VIH-1 et module également l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMH-I et CMH-II) *(Garcia JV et Miller AD, Nature, 1991 ; Schwarz O. et al, Nat Med, 1996 ; Stumpher-Cuvelette P et al., PNAS, 2001)*. Pour finir, la protéine Vpu (*Viral protein U*) dégrade CD4 dans le réticulum endoplasmique (RE) en l'adressant vers les voies de dégradation protéasomales *(Margottin et al., Mol Cell, 1998)*, et favorise la libération des particules virales en contrecarrant l'action de BST-2 *(Neil SJ et al, Nature, 2008 ; Van Damme N et al., Cell Host Microbe, 2008)*, un autre facteur de restriction, dont la fonction sera détaillée plus tard en partie IV.

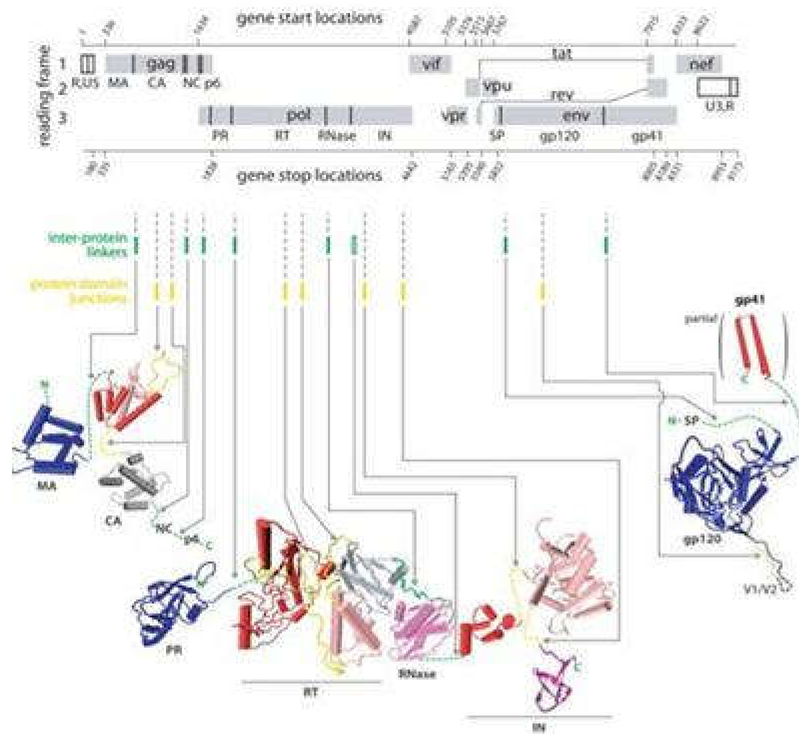


Figure 6 : Organisation, structure et lien de l'ARN viral avec les protéines de structure. En haut : organisation génomique. Au centre : Linker inter-protéines issues des précurseurs polyprotéiques (barres vertes) et boucles non-structurées des peptides (barres jaunes). En bas : structures des grosses protéines virales *(Watts JM. et al., Nature, 2009)*

II – LE CYCLE REPLICATIF DU VIH-1

Le cycle de réplication viral passe pour une série d'étapes commençant par l'engagement du virion au niveau de la surface cellulaire *via* des récepteurs et se terminant par la libération de particules virales matures **(Figure 7)**. Durant ces phases, le VIH-1 utilise un grand nombre de facteurs cellulaires pour se répliquer, tandis que des facteurs de restrictions tentent de limiter ce processus *(Evans DT et al., Trends Microbiol, 2010 ; Huthoff H et Towers JH, Trends Microbiol, 2008 ; Laguette N. et al., Nature, 2011)*.

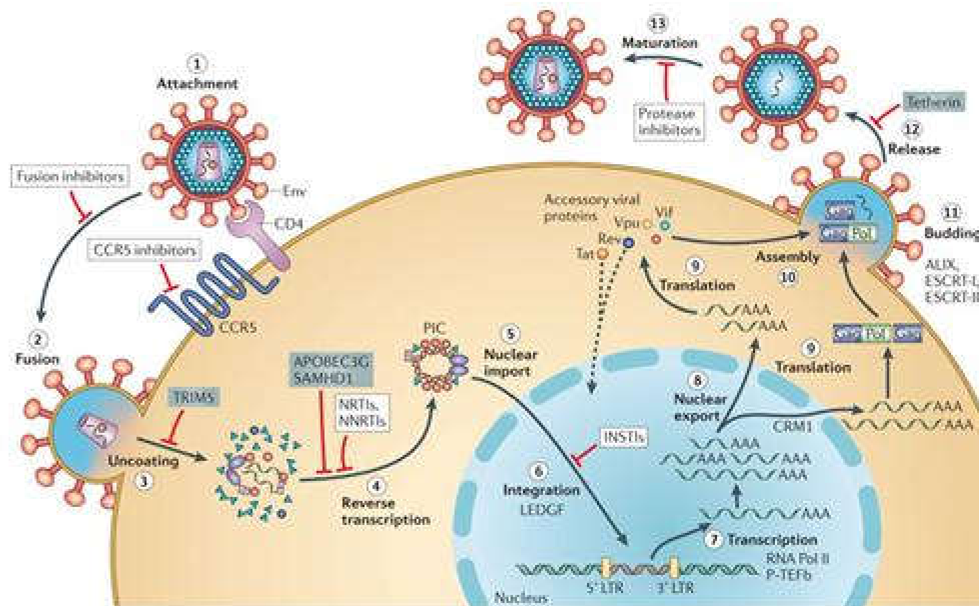


Figure 7: le cycle de réplication du VIH-1. *(Engleman A. et Cherepanov P., Nat Rev Microbiol, 2012)*

A – Les phases précoces du cycle de réplication

1) Reconnaissance et entrée du virus dans la cellule cible

Les spicules de l'enveloppe du VIH-1 sont composés de trimères de TMgp41 et SUgp120 *(Zhu P et al., Nature, 2006 ; Zanetti G et al., PloS Pathog, 2006 ; Liu J et al., Nature, 2008)*. Lorsque la reconnaissance est amorcée, ces spicules subissent des changements conformationnels importants qui entrainent la fusion entre les membranes virales et cellulaire et permettent la libération du *core* viral dans le cytoplasme **(Figure 7 Etapes 1 & 2)**.

Le VIH-1 infecte principalement les lymphocytes T CD4+ et macrophages. L'interaction initiale entre la SUgp120 et le récepteur CD4 induit la formation d'un pont entre les domaines internes et externes du monomère de SUgp120, exposant ainsi le site de liaison pour les protéines co-réceptrices : CCR5 ou CXCR4 *(Kwong PD et al., Nature, 1998 ; Rizzuto CD et al., Science, 1998)*. L'engagement de ces co-récepteurs entraine l'insertion du peptide de fusion, situé à la partie N-terminale de la TMgp41, dans la membrane plasmique cellulaire. Ces événements entrainent d'importantes modifications conformationnelles de la TMgp41 et permettent la fusion entre les membranes virale et cellulaire *(Chan DC et al., Cell, 1997 ; Weissenhorn et al., Nature, 1997 ; Buzon V et al., PLoS Pathog, 2010)*.

2) Décapsidation du génome viral

La décapsidation du VIH-1 se définie comme la déstructuration de la capside virale et se met en place dans le cytoplasme de cellules infectées avant l'entrée du génome viral dans le noyau **(Figure 7 Etape 3)**. Il s'agit d'une étape obligatoire lors des premières étapes de l'infection et s'accompagne de la transcription inverse du génome viral et de la formation du complexe de pré-intégration. L'étude de la nature et du *timing* de la

décapsidation du VIH-1 est depuis longtemps très difficile en raison du caractère labile de la capside en conditions expérimentales. Bien que les études précédentes suggéraient que la décapsidation s'effectuait immédiatement après l'entrée du virus dans la cellule, attribuant alors un rôle trivial à la capside, des résultats récents montrent que la décapsidation se met en place quelques heures après l'entrée du virus, et que la capside joue un rôle primordial dans le transport vers le noyau *(Forshey BM et al., J Virol, 2002)*, dans la transcription inverse *(Klarmann GJ et al., J Biol Chem, 1993)* et dans l'import nucléaire *(Dismuke DJ et al., J Virol, 2006)*. Cette décapsidation tardive suggère que la capside interagit de façon privilégiée avec le cytosquelette et les composants cytoplasmiques pendant son transport vers le noyau.

3) Transcription inverse du génome viral

Les étapes de transcription inverse consistent en une série de réactions chimiques complexes qui conduisent à la synthèse d'une molécule d'ADN double brin à partir de l'ARN viral. **(Figure 7 Etape 4**) *(Sarafianos SG et al., J Mol Biol, 2009 ; Herschhorn A & Hizi A, Cell Mol Life Sci, 2010)*. Ce processus est catalysé par une enzyme virale : la transcriptase inverse.

La RT est un hétérodimère issu du clivage du précurseur Gag-Pol, constitué de deux sous-unités : la p66 et p51. La p66 porte deux sites actifs : un site d'ADN-polymérase ADN/ARN dépendant en partie C-terminale et un site RNAse H qui dégrade les composés ARN lors de la formation de molécules hybrides ADN/ARN. La sous unité p55 quant à elle ne possède pas d'activité enzymatique mais joue un rôle structural.

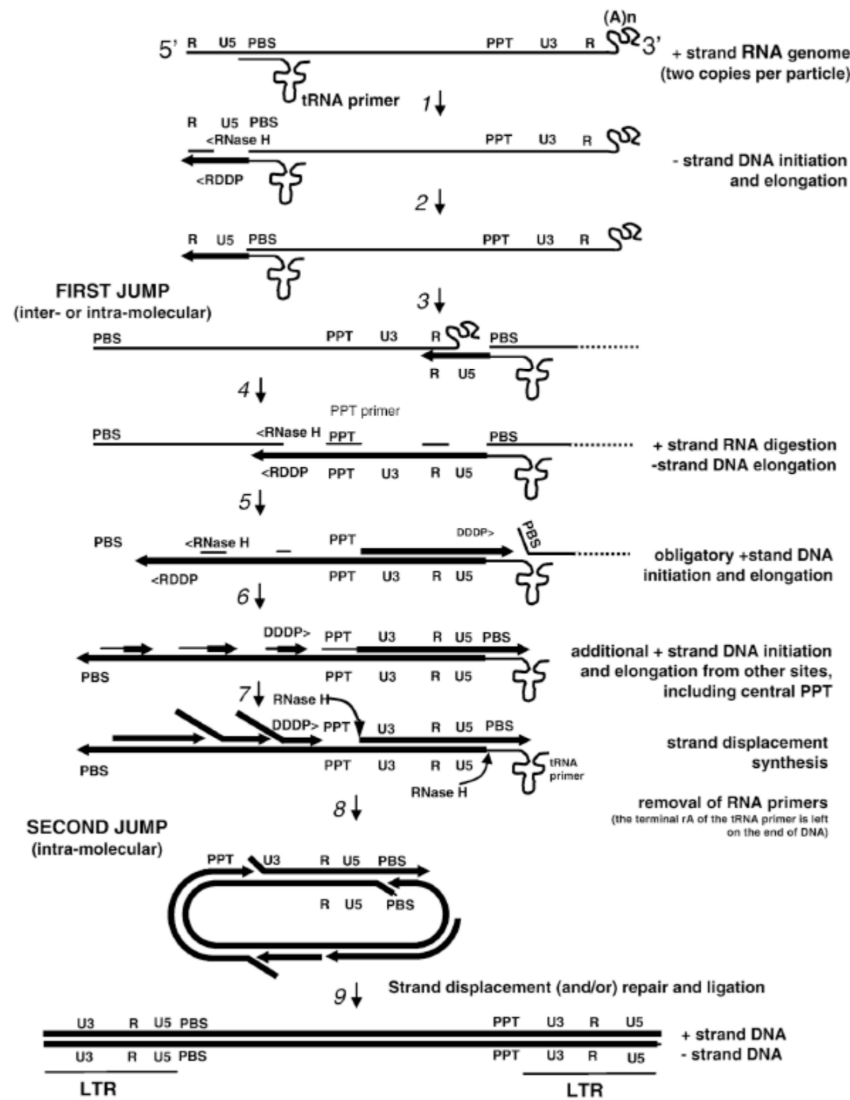


Figure 8: transcription inverse du génome viral *(Engelman A & Cherepanov P, Nat Rev Microbiol, 2012)*

Comme la majeure partie des ADN polymérases, la RT a besoin d'une amorce (*primer*) et d'une matrice pour l'initiation de la transcription inverse. La synthèse de l'ADN est initiée à partir d'un ARNt^{Lys} d'origine cellulaire. A proximité de l'extrémité 5' du génome viral, on trouve une séquence de 18 nucléotides appelée *primer biding site* (PBS) complémentaire aux 18 nucléotides situés à l'extrémité 3' de l'ARNt^{Lys}. L'ARNt^{Lys} s'hybride sur le PBS. Le génome viral servant de matrice forme le brin positif (+). Le premier brin d'ADN synthétisé (brin négatif ou brin -) est initié à partir de l'ARNt^{Lys} permettant une copie du génome viral par la RT à partir du 5'. La synthèse de ce brin – génère un hybride ADN/ARN qui va servir de substrat à la RNAse H. La RNAse H dégrade le brin d'ARN laissant ainsi seul le brin d'ADN -. Les séquences nucléotidiques aux extrémités 5' et 3' du génome viral sont identiques (séquences LTR pour *long tandem repeat*). Cela permet au brin – de l'ADN de s'hybrider à la séquence en 3' d'un des deux brins ARN viral, étape appelé « premier saut » ou « transfert du brin - ». Après que ce brin d'ADN naissant se soit hybridé avec les séquences répétées, la synthèse du brin ADN – peut continuer le long de l'ARN viral. Au fur et à mesure que l'élongation progresse, la RNAse H dégrade le brin d'ARN. Même si la plupart des sites de clivages de la RNAse H ne

sont pas spécifiques, il existe un site riche en purines (*polypurine tract sequence* ou PPT) près de l'extrémité 3' de l'ARN viral qui s'avère résistant au clivage par la RNAse H et servira se matrice pour la synthèse du brin d'ADN + **(Figure 8)** *(Sarafianos SG et al, J Mol Biol, 2009 pour revue)*.

4) Intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire

L'intégration du génome viral **(Figure 9)** fournit au virus un environnement favorable à l'expression de ses gènes, assure la transmission du provirus aux cellules filles lors de la mitose et est à la base de la formation des réservoirs viraux latents dans les cellules qui résistent aux traitements par les HAART. A l'intérieur du complexe de transcription inverse (RTC) la RT rétrotranscrit l'ARN en ADN double brin contenant une copie des séquences LTR à chaque extrémité. L'IN va alors modifier ces extrémités LTRs, ce qui va entrainer la formation de séquences flanquantes de deux nucléotides CA *(Fujiwara T et al., Cell, 1988 ; Roth MJ et al., Cell, 1989)*, arborant des groupes hydroxyles 3'-OH qui serviront à la seconde réaction catalysée par l'IN : le transfert de brin. Cette étape de *processing* de l'ADN viral définit la transition entre le RTC et le PIC.

Dans l'étape de transfert de brin, l'IN utilise l'oxygène du 3'-OH pour couper l'ADN chromosomique et joint de manière simultanée les extrémités 5' de l'ADN viral à l'ADN chromosomique *(Fujiwara T et al., Cell, 1988 ; Brown PO et al., PNAS, 1989 ; Engelman A et al., Cell, 1991)*. Les extrémités 5' non-jointives issues de la recombinaison de ces ADN sont réparées par les enzymes de réparation cellulaires *(Yu SF et al., Science, 1996)*.

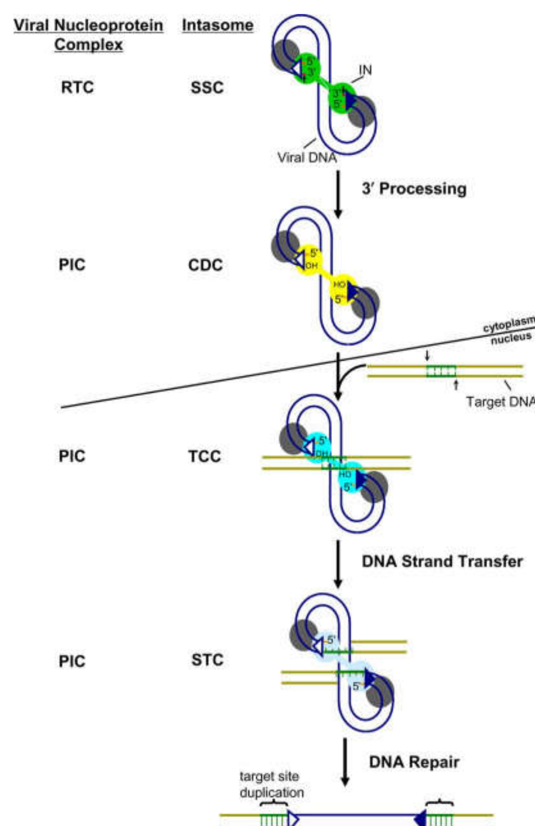


Figure 9: Mécanismes de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. *(Krishnan L & Engelman A., J Biol Chem, 2012)*

B – Les phases tardives du cycle de réplication

1) Transcription de l’ADN viral et régulation de l’expression des protéines virales.

L’ADN viral intégré dans le génome de la cellule hôte constitue alors une unité de transcription indépendante avec son propre promoteur. Selon l’état d’activation de la cellule hôte et l’influence de nombreux facteurs cellulaires et viraux, le provirus peut rester dans une phase latente ou peut entrer dans une phase transcriptionnellement active (*Nekhai S & Jeang KT, Future Microbiol, 2006*).

Le 5’-LTR du VIH-1 sert de site d’initiation de la transcription. Les LTR contiennent également les éléments cis-régulateurs nécessaires à la synthèse de ses ARNm (*Freed EO, Somat Cell Mol Genet, 2001*). Par la suite, des phénomènes d’épissages conduisent à la formation de trois catégories d’ARNm : des ARNm multi-épissés codant les protéines Tat, Rev et Nef ; des ARNm mono-épissés codant le précurseur de l’enveloppe virale gp160 et les protéines Vif, Vpr et Vpu ; et des ARNm non-épissés codant les précurseurs Pr55Gag, Gag-Pol, et les ARN génomiques (ARNg) (**Figure 10**). Les ARNm sont ensuite exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines par la machinerie cellulaire.

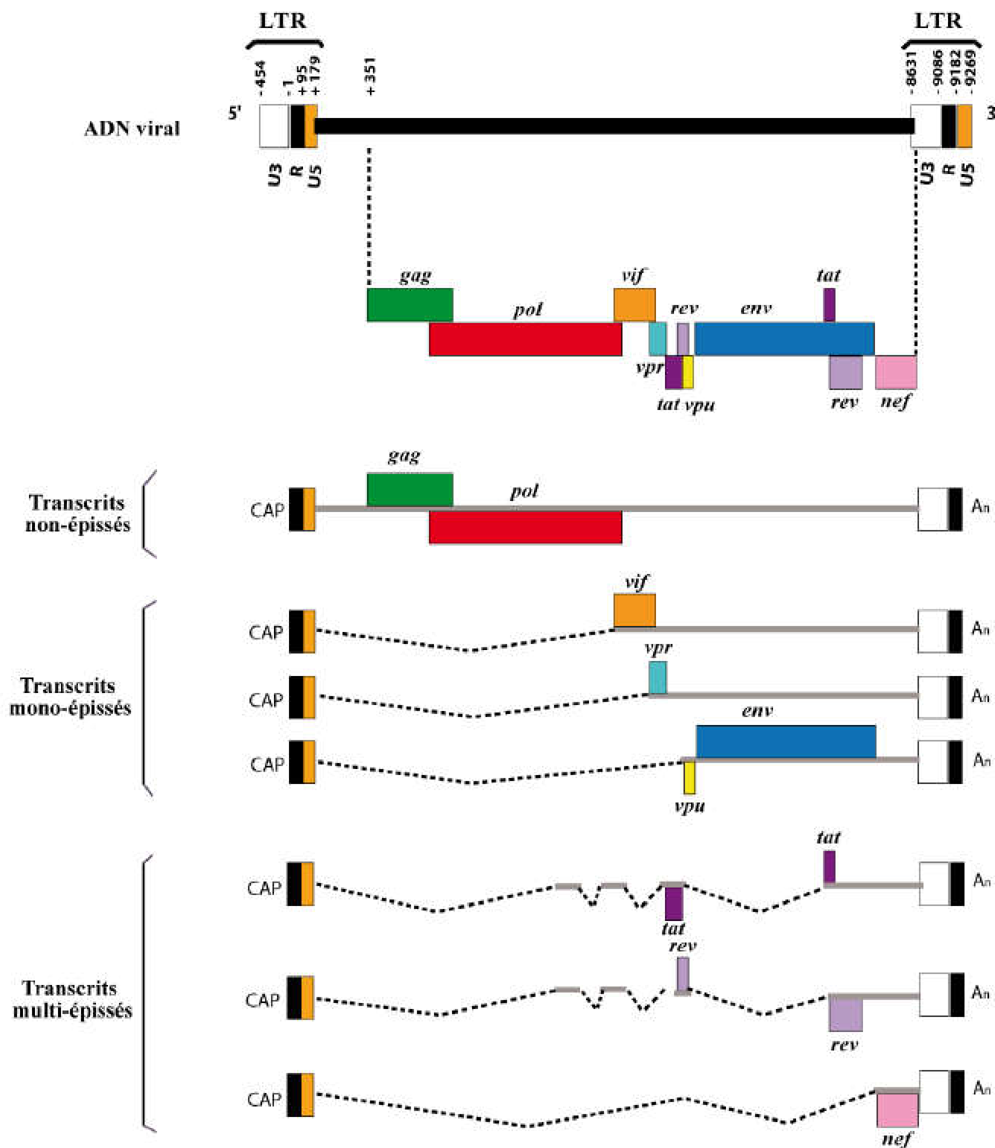


Figure 10: Synthèse et régulation des ARNm et ARNg viraux. La transcription du génome du VIH-1 conduit à la formation de transcrits qui peuvent etre regroupés en trois classes : les ARN viraux non-épissés codans pour les polyprotéines Pr55Gag et Gag-Pol et qui constituent l'ARN génomique viral, les ARN viraux mono-épissés codant pour les protéines Vif, Vpu, Vpr et Env, et les Arn viraux multi-épissés codant pour les protéines Tat, Rev et Nef.

De nombreuses études ont souligné le rôle de la protéine Rev dans la régulation des phénomènes d'épissages, et plus particulièrement dans la synthèse des ARNm non- et mono-épissés, mais aussi dans les mécanismes d'export des ARNm vers le cytosol (*Malim MH et al., Nature, 1989* ; *Strebel K, Aids, 2003*). Les ARNm multi-épissés codant les protéines Tat, Rev et Nef sont les premiers à être synthétisés, exportés dans le cytoplasme et traduits en protéines. La protéine Rev, impliquée dans la synthèse et l'export des ARNm mono- et non-épissés (*Wu Y & Marsh JW, Microbes Infect, 2003*), et la protéine Tat, impliquée dans l'activation de la transcription (*Gatignol A, Adv Pharmacol, 2007*), sont ensuite ré-importées dans le noyau. Les ARNm viraux non- et mono-épissés sont alors tardivement synthétisés et traduits en précurseurs protéiques à l'origine des protéines structurales et enzymatiques nécessaires à la formation de nouveaux virions. Après la transcription, certains ARN viraux vont être également capables d'échapper aux phénomènes d'épissage. Ces

derniers vont alors être exportés vers le cytoplasme, puis acheminés vers les sites d'assemblage viraux pour servir de génome aux nouvelles particules virales en cours de formation.

2) Assemblage et bourgeonnement du VIH-1

a. Le rôle pilote du précurseur $Pr55^{Gag}$

Les protéines Gag sont les chefs d'orchestres de l'assemblage des rétrovirus en donnant les composants structuraux des virions et en recrutant des facteurs cellulaires essentiels à la formation et au bourgeonnement des particules dans des cellules infectées (*Gottlinger HG ; Aids, 2001*). Le processus d'assemblage est essentiellement conduit par les différentes protéines issues du Pr55Gag à savoir la MA, la CA, la NC et la protéine p6. L'interaction de la MA avec la membrane cible est facilitée par une myristylation cotraductionnelle de sa région N-terminale (*Gottlinger HG et al., PNAS, 1989*) et cette interaction est stabilisée par un ensemble de résidus basiques qui lient les phospholipides chargés négativement à la face cytosolique de la membrane interne (*Zhou W et al., J Virol, 1994*). Le domaine globulaire de la tête de la CA régule également l'assemblage en dissimulant l'acide myristique à de faibles concentrations de Gag (*Saad JS et al., PNAS, 2006 ; Zhou W & Resh MD, J Virol, 1996 ; Spearman P et al., J Virol, 1997*) et en facilitant les interactions entre Gag et la membrane (*Perez-Caballero D et al., J Virol, 2004*). La formation du bourgeonnement viral est coordonné par des interactions Gag-Gag et sont principalement médiées par la CA et la NC. L'ARN viral joue également un rôle essentiel dans l'assemblage viral en offrant une structure facilitant les interactions Gag-Gag (*Campbell S et al, J Virol, 1995*) et en encodant des signaux de trafics requis pour diriger Gag aux sites d'assemblages viraux (*Swanson CM et al., Traffic, 2006 ; Swanson CM et al., Embo J, 2004*).

La dernière étape de l'assemblage de VIH-1 correspond à la scission membranaire, événement coordonné par le domaine de bourgeonnement tardif (*late domain* ou L-domain) de la partie C-terminale de Gag, appelé domaine p6 (*Huang M et al., J Virol, 1995 ; Gottlinger HG et al., PNAS, 1991*). A la différence des autres domaines de Gag, p6 ne semble pas jouer un rôle structural dans le VIH-1 mais sert principalement d'adaptateur qui recrute les cofacteurs cellulaires nécessaires à la séparation des particules virales naissantes de la membrane plasmique (*Morita E et al., Annu Rev Cell Dev Biol, 2004*). Le motif peptidique PT/SAP (*Huang M et al., J Virol, 1995 ; Gottlinger HG et al., PNAS, 1991*), également retrouvé chez d'autres virus à ARN enveloppés tels que Ebola, HIV-2, HTLV et le virus de Lassa (*Bouamr F et al., J Virol, 2003 ; Martin-Serrano J et al., Nat Med, 2001 ; Myers EL et al., J Virol, 2002 ; Perez M et al., PNAS, 2003*), est essentiel à l'activité du L-domain de p6Gag.

b. Implication de la machinerie ESCRT dans le bourgeonnement

Les composants de la machinerie ESCRT (**Figure 11**) sont impliqués dans l'adressage de protéines membranaires ubiquitinylées vers les corps multi-vésiculaires (*multivesicular bodies* ou MVBs). Ce sont des régulateurs clés dans de nombreux processus biologiques telles que la croissance, la survie cellulaire et la cytokinèse. De plus, certains virus dont le VIH-1 piratent et utilise cette machinerie pour leur bourgeonnement à la membrane, précédent la libération des particules virales.

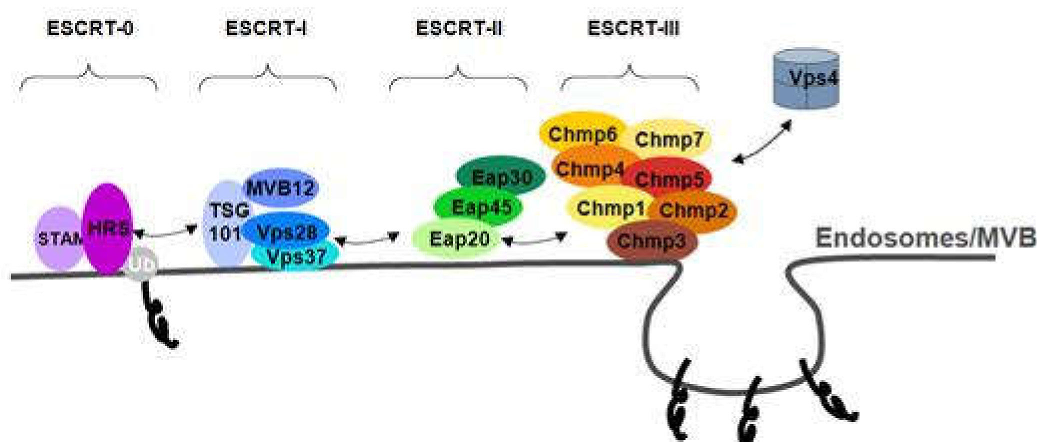


Figure 11 : la machinerie ESCRT et ses représentants protéiques.

L'identification de Tsg101 comme cofacteur cellulaire facilitant le bourgeonnement du VIH-1 a permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans les phases tardives du cycle viral *(Martin-Serrano J et al., Nat Med, 2001 ; Garrus JE et al., Cell, 2001 ; Demirov DG et al., PNAS, 2002*). Le bourgeonnement du VIH-1 et d'autres virus enveloppés est topologiquement identique à la formation de vésicules intra-luminales dans les MVB (**Figure 12**)

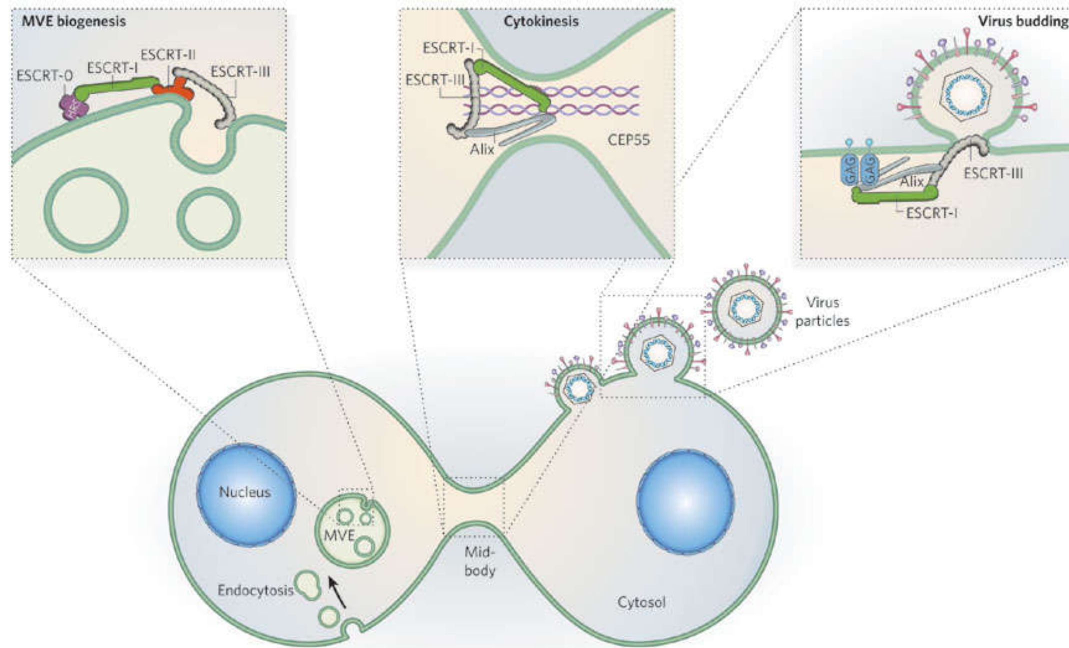


Figure 12: Implication de la machinerie ESCRT dans 3 types d'abscission membranaire topologiquement équivalent. ESCRT-III est un complexe conservé dans l'abscission des ponts membranaires. Dans la biogénèse des MVBs (gauche), ESCRT-III est recruté par ESCRT-0, -I et –II. Dans la cytokinèse (milieu), ESCRT-III est recruté par les protéines du centrosome CEP55 et Alix d'ESCRT-I. Dans le bourgeonnement du VIH-1 (droite), ESCRT-III est recruté par la protéine virale Gag et ESCRT-I. (*Raiborg C & Stenmark H, Nature, 2009*)

Ce processus implique la voie de signalisation des *class E vacuolar protein sorting* (VPS) qui incluent tout un ensemble de protéines cellulaires facilitant l'adressage de protéines ubiquitinylées vers la dégradation lysosomale (*Katzmann DJ et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2002*). Cette analogie topologique entre le bourgeonnement viral et la formation des MVB a permis de mieux comprendre les mécanismes qui facilitent les dernières étapes du cycle viral.

Tsg101 est l'orthologue mammifère de la protéine VPS23 de la levure, et est une sous unité du complexe de 350 kDa d'ESCRT-I (*endosomal sorting complex required for transport type-I*) qui comprend d'autres protéines : Vps28 et Vps37 (*Katzmann DJ, Cell, 2001*). Ce complexe reconnait des protéines transmembranaires ubiquitinylées et permet leur adressage vers les MVB. Chez la levure, le déplétion d'un seul composant du complexe ESCRT-I conduit à l'inhibition de l'adressage des protéines ubiquitinylées et conduit à la formation de structures vésiculaires multilamellaires anormales (*Babst M, Traffic, 2005 ; Raymond CK et al., Mol Biol Cell, 1992*). Pour cette raison, Tsg101 est requis pour le bourgeonnement du VIH-1 qui encode des L-domains possédant le motif PTAP, mécanisme topologique équivalent au bourgeonnement vésiculaire dans les MVBs (**Figure 13**)

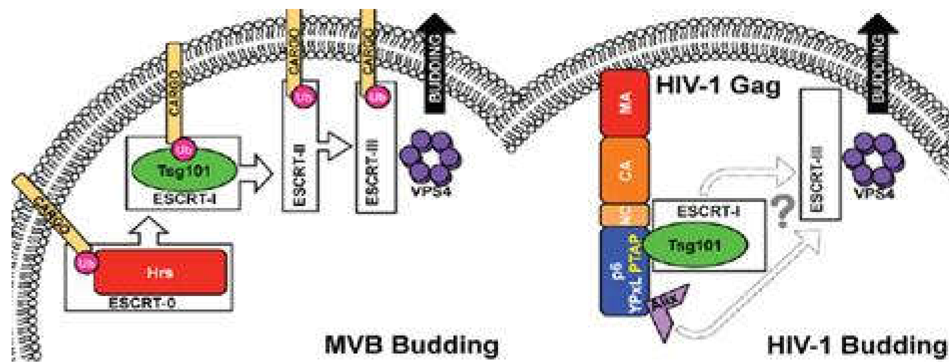


Figure 13: Parallèles entre les MVBs et le bourgeonnement viral. A gauche : Adressage des protéines ubiquitinylées (Ub) dans les vésicules bourgeonnant dans les MVBs *via* les complexes ESCRT. La sous-unité d'ESCRT-0 HRS initie la cascade à partir de la membrane endosomale. HRS contient un motif PSAP qui interagit avec le domaine UEV de Tsg101, permettant le recrutement des autres ESCRT-I, -II et –III. Le complexe ESCRT-III joue de concert avec Vps34 pour catalyser la scission finale des membranes. A droite : le bourgeonnement du VIH-1 nécessite un adressage correct de Gag à la membrane plasmique grâce à l'extrémité N-terminale de Gag. Tout comme le bourgeonnement vésiculaire des MVBs, le VIH-1 utilise la machinerie ESCRT. Le domaine p6 de Gag contient deux motifs PTAP et YPxL qui lient respectivement Tsg101 et Alix. Le bourgeonnement du VIH-1 requiert ESCRT-III et Vps34 mais ESCRT-II est court-circuité. *(Kuo S & Freed EO, PNAS, 2012)*

Il existe un deuxième L-domain chez Gag correspondent à un motif dégénéré LYPxL, permettant la liaison de Gag avec AIP1/Alix avec une faible affinité (*Fisher RD et al., Cell, 2007*). Ce domaine intervient de façon synergique avec la liaison PTAP/Tsg101. La structure cristallographique du complexe Tsg101-PTAP montre que la reconnaissance du motif PTAP par le domaine de liaison de l'*E2-conjugating ubiquitin enzyme* (E2) de Tsg101 (domaine UEV) se fait *via* deux poches distinctes le long du sillon de liaison (*Pornillos O et al., Nat Struct Biol, 2002*), suggérant que cette interaction pourrait faire le fruit de nouvelles cibles thérapeutiques. D'autres études suggèrent que l'ubiquitinylation de p6 jouerait un second rôle dans le bourgeonnement, celui d'augmenter l'affinité de Gag par Tsg101 d'un facteur 10 (*Garrus JE et al., Cell, 2001*) et que l'UEV de Tsg101 ubiquitinylé (UEV-Ub) montre que l'UEV de Tsg101 peut lier l'Ub et le motif PTAP simultanément (*Munshi UM et al., J Biol CHem, 2007*).

Il est clair que le complexe ESCRT-I est requis dans son intégralité pour le bourgeonnement viral *via* le motif PTAP de p6. Des études ont montré que la transfection transitoire de Vps28 et Vps37 entraine leurs relocalisations aux sites d'assemblage viraux par Gag (*Eastman SW et al., J Biol Chem, 2005 ; Martin-Serrano J et al., J Virol, 2003*) et que le bourgeonnement du VIH-1 ne peut être réalisé en présence de mutants de Tsg101 incapables de lier Vps28 (*Martin-Serrano J et al., J Virol, 2003* ; *Stuchell MD et al., J Biol Chem, 2004*). De plus, quatre orthologues humains de Vps37 chez la levure ont récemment été identifiés et des expériences d'ARNi montrent qu'au moins deux d'entres eux sont requis dans la reconnaissance du motif PTAP des L-domain (*Eastman SW et al., J Biol Chem, 2005*).

Etant donné que certains composants du complexe ESCRT-II interagissent avec ceux des ESCRT-I et –III, l'implication de ESCRT-II dans le bourgeonnement viral avait été proposé (*Pornillos O et al., Trends Cell*

Biol, 2002 ; von Schwedler UK et al., Cell, 2003). Cependant, ESCRT-II ne semble pas essentiel dans le processus de bourgeonnement (*Martin-Serrano J et al., PNAS, 2003 ; Langelier C et al., J Virol, 2006*), suggérant qu'il y aurait un mécanisme alternatif permettant le lien entre ESCRT-I et ESCRT-III. Alix pourrait potentiellement connecter ESCRT-I et ESCRT-III (*Strack B et al., Cell, 2003* ; *von Schwedler UK et al., Cell, 2003 ; Martin-Serrano J et al., PNAS, 2003)* ; mais des études fonctionnelles montrent que l'activité du motif PTAP du L-domain ne requiert pas Alix (*Martin-Serrano J et al., PNAS, 2003*), suggérant donc l'existence d'un autre facteur protéique faisant la liaison entre ESCRT-I et ESCRT-III.

Il est accepté qu'ESCRT-III constitue le *core* de la machinerie de triage protéique et entraine l'invagination membranaire pendant la formation des MVB (*Hurley JH et al., Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006*). ESCRT-III est constitué de deux sous-complexes, un complexe à proximité de la membrane (Vps2 et Vps20) qui interagit avec la membrane endosomale, et un complexe périphérique (Vps24 et Vps32) qui recrute les protéines accessoires (*Babst M et al., Dev Cell, 2002*). Un rôle essentiel d'ESCRT-III dans le bourgeonnement viral a été initialement suggéré par l'inactivation du bourgeonnement par la surexpression d'une forme inactive de Vps4 (*Garrus JE et al., Cell, 2001 ; Martin-Serrano J et al., J Virol, 2003 ; Tanzi GO et al., J Virol, 2003*). De plus, la surexpression d'autres composants d'ESCRT-III (CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C, CHMP4C, CHMP2A, CHMP3 et CHMP5) induit également l'arrêt du bourgeonnement mimant le phénotype induit par les mutants du L-domain de p6 (*Strack B et al., Cell, 2003 ; von Schwedler UK et al., Cell, 2003 ; Martin-Serrano et al., PNAS, 2003)*. D'autres évidences montrant le rôle d'ESCRT-III ont été présentées dans deux articles montrant que des mutations dans la protéine Alix inhibant l'interaction Alix/CHMP4, empêchent le bourgeonnement viral (*Fisher RD et al., Cell, 2007 ; Usami Y et al., J Virol, 2007*).

D'autres observations indiquent que chaque L-domain identifié chez les virus enveloppés facilite le bourgeonnement viral *via* un mécanisme commun. Il s'avère que la plupart des L-domain sont interchangeables (*Parent LJ et al., J Virol, 1995*) et des résultats récents montrent que le bourgeonnement viral peut être engagé grâce à d'autres L-domain qui requièrent les complexes ESCRT-III et la protéine Vps4 (*Garrus JE et al., Cell, 2001 ; Strack B et al., Cell, 2003 ; Martin-Serrano J et al., PNAS, 2003 ; Tanzi GO et al., J Virol, 2003*). En plus de l'interaction entre PTAP et Tsg101, le motif PPxY recrute tout un ensemble d'E3 ubiquitine ligase NEDD4-like (WWP1, WWP2 et ITCH) (*Bouamr F et al., J Virol, 2003 ; Heidecker G et al., J Virol, 2004 ; Kikonyogo A et al., PNAS, 2001 ; Martin-Serrano J et al., J Cell Biol, 2005*) alors que le motif LYPxL permet le recrutement d'ALIX pour augmenter la libération des particules virale (**Figure 14**) (*Strack B et al., Cell, 2003 ; von Schwedler UK et al., Cell, 2003 ; Martin-Serrano J et al., PNAS, 2003*).

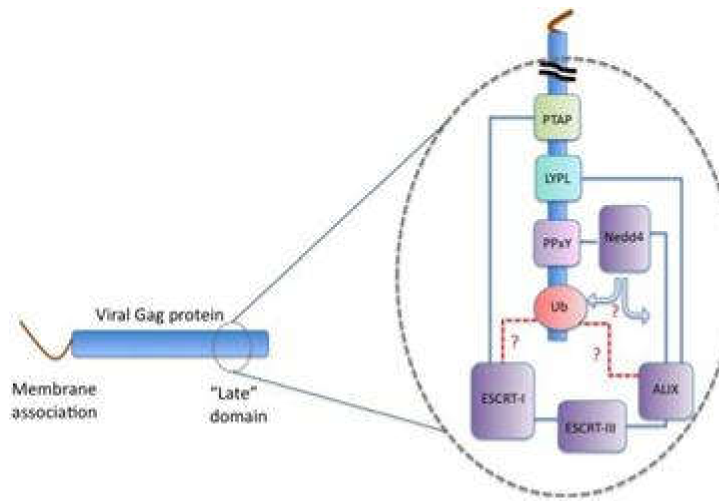


Figure 14: Structure et motifs présents dans le précurseur Pr55Gag. Les protéines Gag contiennent de L-domaines qui interagissent avec différents facteurs protéiques cellulaires pour la réplication virale. Les motifs PTAP du L-domaine de p6 recrutent ESCRT-I *via* des interactions avec le domaine UEV de Tsg101, les motifs LYPL/LxxLY recrutent Alix *via* des interactions avec son V-domaine et PPxY recrute des E3 ubiquitine ligases de la famille de Nedd4.

d. Le site d'assemblage et le bourgeonnement viral

Il est classiquement décrit que l'assemblage et le bourgeonnement du VIH-1 s'effectue à la membrane plasmique. Cet assemblage viral repose sur l'association du Pr55Gag myristylé à au feuillet interne de la membrane plasmique et à s'y oligomériser pour induire le bourgeonnement des virions (*Campbell SM et al., J Clin Virol, 2001; Jouvenet N et al., PLoS Biol, 2006; Ono A & Freed EO, PNAS, 2001; Ono A & Freed EO, J Virol, 2004; Ono A et al., Virology, 2007; Welsch S et al., PLoS Pathog, 2007*). Différentes études ont montré que cet assemblage et ce bourgeonnement viral sont localisés au niveau de microdomaines membranaires particuliers, riches en sphingolipides, cholestérol, protéines kinases de la famille SRC et en protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) (*Bhattacharya J et al., J Virol, 2006 ; Graham DR et al., J Virol, 2003; Hermida- Matsumoto L & Resh MD, J Virol, 2000 ; Laude AJ & Prior IA, Mol Membr Biol, 2004*). Ils serviraient de plate-formes de concentration et d'interaction au Pr55Gag myristylé (*Nguyen DH & Hildreth JE, J Virol, 2000*) et aux complexes glycoprotéiques d'enveloppe palmitoylés au niveau de deux résidus cystéine du domaine cytoplasmique de la TMgp41 (*Rousso I et al., PNAS, 2000*) pour permettre la formation de virions complets (*Ono A et al., Virology, 2007*). D'autres travaux ont également montré que les microdomaines où s'effectuait le bourgeonnement viral étaient riches en tétraspanines (*Deneka M et al., J Cell Biol, 2007 ; Grigorov B et al, Retrovirology, 2009 ; Jolly C & Sattentau QJ, J Virol, 2007 ; Nydegger S et al., J Cell Biol, 2006*).

La composition de l'enveloppe virale elle-même composée de grandes quantités de cholestérol, de protéines ancrées au GPI et de tétraspanines, semble corroborer un tel bourgeonnement au sein de ces domaines (*Brugger B et al., PNAS, 2006 ; Graham DR et al., J Virol, 2003*).

Dans les macrophages, il a été observé un bourgeonnement et une accumulation de particules virales essentiellement dans des compartiments vacuolaires intracytoplasmiques (*Gendelman HE et al., J Exp Med,*

1988 ; Jouve M et al., Cell Host Microbe, 2007 ; Orenstein JM et al., J Virol, 1988). De nombreuses études ont visé à identifier la nature de ces compartiments (*Carter CA & Ehrlich LS, Annu Rev Microbiol, 2008 ; Chertova E et al., J Virol, 2006 ; Nermut MV et al., Virology, 2003 ; Ono A and Freed EO, J Virol, 2004*). Ces vacuoles présentent des marqueurs (molécules du CMH de classe II, CD63) caractéristiques des compartiments endosomaux tardifs/MVB, et notamment des compartiments du CMH de classe II (*Pelchen-Matthews A et al., J Cell Biol, 2003 ; Perlman M & Resh MD, Traffic, 2006 ; Raposo G et al., Traffic, 2002*). L'enveloppe des virions produits en macrophages contient elle-même de grandes quantités de molécules CMH de classe II et de CD63, ce qui semble corroborer un bourgeonnement au sein de ces compartiments. Cependant, l'accumulation de particules virales dans un compartiment intracellulaire pose le problème du mécanisme de libération des particules virales libres dans l'environnement extracellulaire. L'existence d'un phénomène d'exocytose a été évoquée après avoir observé la fusion de compartiments contenant des particules virales avec la membrane plasmique (*Gould SJ et al., PNAS, 2003 ; Nguyen DG et al., J Biol Chem, 2003*).

3) Processus de maturation virale

Dans un premier temps, les particules virales sont libérées dans l'environnement extracellulaire sous une forme immature. Il se produit alors un processus de maturation protéolytique du Pr55Gag qui s'effectue au niveau de particules virales bourgeonnantes ou relarguées dans le milieu extracellulaire (*Gross I et al., EMBO J, 2000 ; Shehu-Xhilaga M et al. J Virol, 2001; Wiegers K et al., J VIrol, 1998*). Cette étape est essentielle à l'acquisition du pouvoir infectieux de la particule virale (*Chen SW et al., Virology, 2004 ; Pettit SC et al., J Virol, 2005*). Ce processus consiste en un clivage protéolytique des précurseurs Pr55Gag et Gag-Pol permettant la génération des diverses protéines structurales et enzymatiques virales. Ces clivages protéolytiques sont réalisés par une enzyme virale : la protéase, active sous sa forme homodimérique. Ainsi, le dimère de Gag-Pol, formé durant l'assemblage, doit dans un premier temps s'autocliver pour libérer une protéase dimérique mature (*Chen SW et al., Virology, 2004 ; Pettit SC et al., J Virol, 2004*). La protéase a la capacité de reconnaître sur un même Pr55Gag plusieurs sites de clivage avec une efficacité différente, ce qui va permettre une maturation protéolytique séquentielle du Pr55Gag dans un ordre bien précis (*Gross I et al., EMBO J, 2000 ; Krausslich HG et al., J Virol, 1995 ; Mirambeau G et al., PLoS ONE, 2007; Shehu-Xhilaga M et al. J Virol, 2001 ; Wiegers K et al., J Virol, 1998*) (**Figure 15**). Après le clivage intramoléculaire initial de la polyprotéine Pr55Gag par la protéase localisée en *cis* (*Pettit SC et al., J Virol, 2004*), la protéase libère la nucléocapside, qui va former avec l'ARN viral, le complexe nucléoprotéique central du virion. La protéase sépare ensuite la matrice de la capside, et vont alors, pour la MA, tapisser l'intérieur de la bicouche lipidique et, pour la CA, former la capside conique qui protège l'ARNg. Enfin, la maturation du virion s'achève lorsque la protéase catalyse le clivage des peptides situés aux extrémités de la capside et de la nucléocapside (p1 et p2). La dernière étape de clivage entre la protéine capside et le peptide p1 aboutit à une condensation de la nucléocapside et de l'ARNg (*Gross I et al., EMBO J, 2000 ; Krausslich HG et al., J Virol, 1995*) et à

l'apparition d'une structure conique centrale dense aux électrons en microscopie électronique (*Wilk T & Fuller SD, Curr Opin Struct Biol, 1999*).

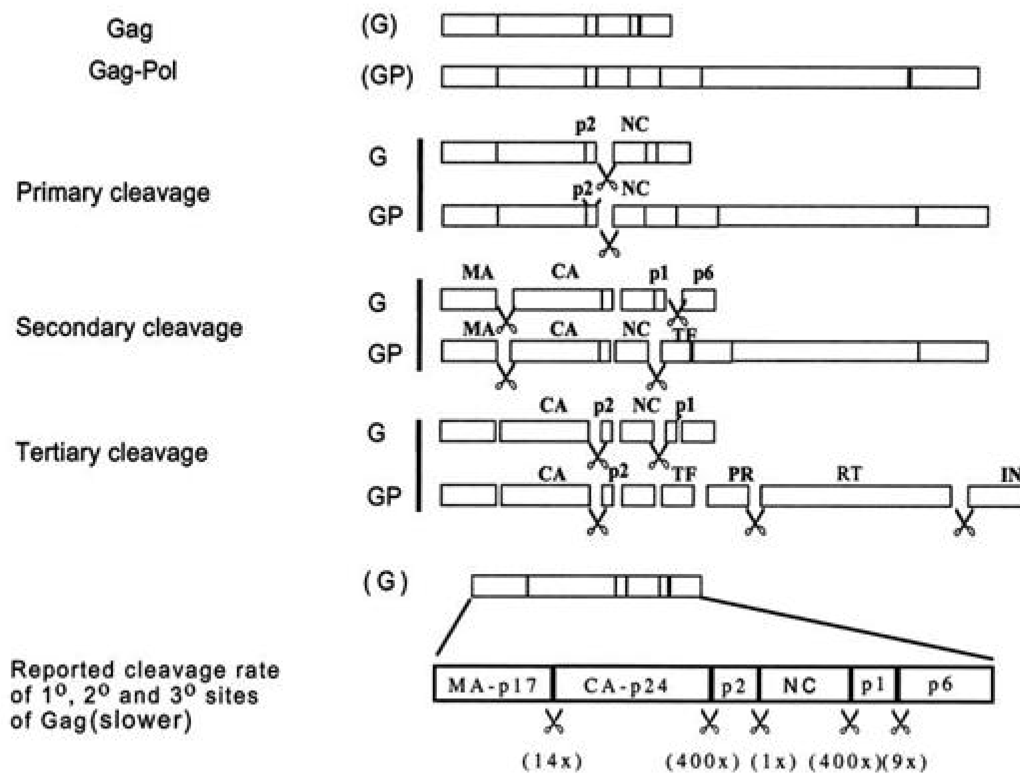


Figure 15: Représentation schématique des clivages protéolytiques séquentiels des précurseurs Pr55Gag (G) et Gag-Pol (GP) par la protéase (PR) virale. Les ciseaux représentent le sites de coupures enzymatiques (*Shehu-Xhilaga M et al., J Virol, 2001*)

III – LES OBSTACLES A LA REPLICATION VIRALE : LES FACTEURS DE RESTRICTION

A – Définition

Les facteurs de restriction possèdent souvent certaines propriétés qui les distinguent des autres protéines *(Malim MH et Bienasz PD, Cold Spring Harb., 2012)*. Plus précisément, *i)* ils fonctionnent de manière dominante et autonome sur la réplication virale dans une simple expérience de culture cellulaire. *ii)* ils sont exprimés de manière constitutive dans certaines lignées cellulaires et leur expression est souvent augmentée par l'interféron. *iii)* ils emploient des mécanismes uniques pour lutter contre la réplication virale. *iv)* ils ont souvent des séquences d'acides aminés variables dues à leur coévolution avec les virus qui ont mis au point des moyens pour les contrecarrer. Et *v)* ils sont souvent (mais pas toujours) contrecarrés par des protéines accessoires virales. A ce jour, 4 facteurs de restriction ciblant le VIH-1 et autres lentivirus de primates ont été décrits: TRIM5α *(Stremlau M et al., Nature, 2004)*, SAMHD1 *(Hrecka K et al., Nature, 2011 ; Lahouassa H et al., Nat Immunol, 2012)*, APOBEC3G *(Sheehy AM et al., Nature, 2002)* et BST-2 *(Neil SJ et al., Nature,*

2008 ; Van Damme M et al., Cell Host Microbe, 2008). Cinq classes de protéines lentivirales – Vif *(Sheehy AM et al., Nature, 2002)*, Vpu *(Neil SJ et al., Nature, 2008 ; Van Damme M et al., Cell Host Microbe, 2008)*, Vpx *(Hrecka K et al., Nature, 2011 ; Lahouassa H et al., Nat Immunol, 2012)*, Nef *(Jia B et al, PLoS Pathog, 2009 ; Zhang H et al, Cell Host Microbe, 2009)*, et Env *(Gupta RK et al., PNAS, 2009 ; Le Tortorec A & Neil SJ, J Virol, 2009)* ont chacune développé la capacité à contrecarrer ces protéines antivirales **(Figure 16).**

En général, l'activité antivirale de ces facteurs de restriction est auto-suffisante : ils agissent seuls plutôt que dans une complexe voie de signalisation. Leur existence au sein d'une lignée cellulaire a permis de définir des lignées « permissives » ou « restrictives » à la réplication virale, en fonction de l'aptitude qu'a un virus mutant à s'y répliquer *(Malim MH et Bienasz PD, Cold Spring Harb., 2012)*.

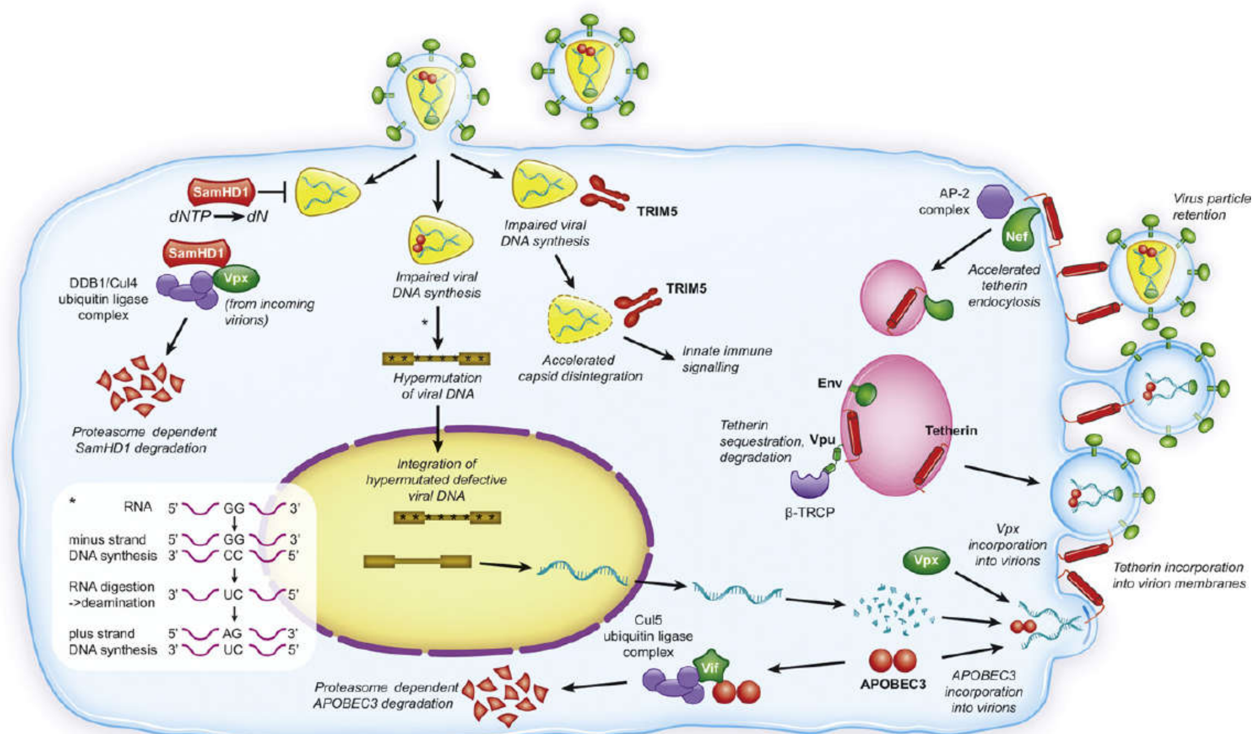


Figure 16: Les facteurs de restriction ciblant le VIH et SIV et leurs antagonistes viraux. *(Blanco-Melo D et al., Immunity, 2012)*

B – Les facteurs de restriction des étapes précoces

1) TRIM5α

TRIM5α fait partie de la famille des TRIpartite Motif Family qui partagent une structure commune mais des fonctions différentes. TRIM5α est constituée de 497 acides aminés pour un poids moléculaire de 57kDa. TRIM5α cible la capside virale juste avant la transcription inverse *(Stremlau M et al., Nature, 2004)* et entraine sa disruption précoce et/ou sa dégradation *(Stremlau M et al., PNAS, 2006)*. Les protéines TRIM sont caractérisées par un domaine N-terminal constitué d'un domaine RING, d'une B-box et de domaines coiled-coil. Le domaine RING de TRIM5α lie 2 atomes de zinc et possède une activité E3 ubiquitine ligase. Le domaine B-box lie également des atomes de zinc et coordonne la multimérisation de TRIM5α *(Diaz-Griffero*

F et al., J Virol, 2009). Cette multimérisation est requise dans son activité antivirale. Sa partie C-terminale comprend un domaine SPRY, portion hautement variable chez les primates. Ce domaine contient les déterminants qui dictent le spectre de rétrovirus qui peuvent être restreint par TRIM5α et est certainement responsable de la liaison avec la CA.

Bien qu'il soit assez clair que la liaison de TRIM5α avec la CA soit requis pour la restriction, certaines partie de l'activité de TRIM5α restent incertains *(Sastri J et Campbell EM, AIDS Res Hum Retroviruses. 2011)*. La restriction se met en place seulement quelques minutes après l'entrée de la capside virale dans le cytoplasme *(Perez-Caballero D et al., J Virol. 2005)*, la transcription inverse est bloquée, et la structure de la capside est altérée, supportant la notion que TRIM5α induit une disruption précoce de la structure de la capside. Cependant, l'inhibition de la transcription inverse et de la disruption de la capside peuvent être bloquées par des inhibiteurs du protéasomes sans affecter l'activité antivirale de TRIM5α *(Wu X et al., PNAS, 2006)*. Cela suggère que les activités biochimiques reportées précédemment ne jouent pas un rôle central dans les mécanismes par lesquels TRIM5α inhibe l'infection.

2) SAMHD1

A la différence des autres facteurs de restriction qui interagissent directement avec des composants viraux, la protéine *Sterile Alpha Motif and HD domaine containing protein 1* (SAMHD1) (626 acides aminés et 72 kDa) exerce une activité antivirale indirecte *(Hrecka K et al., Nature, 2011 ; Laguette N et al., Nature, 2011)*. SAMHD1 réduit la concentration intracellulaire de nucléotides entrainant l'inhibition de la transcription inverse *(Lahouassa H et al., Nat Immunol, 2012)*. SAMHD1 est composé d'un domaine SAM N-terminal et d'un domaine HD C-terminal. Le domaine SAM régule les interactions protéines-protéines et forme occasionnellement des polymères. Il peut aussi être un site spécifique de liaison à l'ARN. Le domaine HD contient des résidus Asp et His conservés et qui sont retrouvés dans les domaines catalytiques des métalloenzymes. Effectivement, SAMHD1 possède une activité phosphohydrolase capable d'inhiber l'infection des lentivirus primates. Il s'agit d'une triphosphohydrolase GTP-dépendante qui hydrolyse les déoxynucléosides triphosphates (dNTPs) en déoxynucléosides + phosphate inorganique *(Goldstone DC et al., Nature 2011 ; Powell RD et al., J Biol Chem, 2011)*. Les 4 dNTPs servent de substrats à SAMHD1. Le GTP entraine sa dimérisation et agit comme activateur et aussi substrat pour l'enzyme. Bien que les RT des lentivirus aient évolué pour fonctionner avec des faibles concentrations en dNTPs, la rétrotranscription du VIH-1 est plus lente dans les cellules de la lignée myéloïdes comparé aux cellules T activées *(Diamond TL, J Biol Chem, 2004)*. Cela pourrait expliquer l'expression de SAMHD1 dans ces lignées myéloïdes qui peut diminuer la concentration de dNTPs en dessous de la constante de Michaelis (K_M) de la RT du VIH-1. Suivant ce constat, un mutant de RT du VIH-1 ayant une faible affinité pour les dNTPs sera particulièrement sensible à SAMHD1 dans des cellules T activées mais pas dans des cellules myéloïdes *(Diamond TL, J Biol Chem, 2004 ; Lahouassa H et al., Nat Immunol, 2012)*.

Les protéines Vpx du VIH-2 et SIV contrecarre ce facteur de restriction en l'adressant vers les voies de dégradation *(Laguette N et al., Nature, 2011 ; Hrecka K et al., Nature, 2011)*. Vpx sert d'échafaudage à la formation du complexe E3 ubiquitine ligase constitué de DCAF1, DDB1 et CUL4, combinant l'ubiquitinylation à la dégradation de SAMHD1 *(Laguette N et al., Nature, 2011 ; Hrecka K et al., Nature, 2011 ; Ahn J et al., J Biol Chem, 2012)*. Bien que Vpx soit un facteur antiviral relativement récent chez les primates, dont on pense issu de la duplication du gène *vpr*, la fonction de dégradation de SAMHD1 précède cette duplication. La quasi-totalité des protéines Vpx de primates et plusieurs (mais pas toutes) protéines Vpr partagent la fonction de contrecarrer l'activité antivirale de SAMHD1 *(Lim ES et al., Cell Host Microbe, 2012 ; Zhang C et al., PLoS ONE, 2012)*. Ce lien d'évolution est supporté par des études de mutagénèses qui ont révélé des motifs hydrophobes conservés chez Vpx/Vpr, requis pour leurs interactions avec SAMHD1 *(Wei W et al., Cell Microbiol, 2012)*. Des *clusters* sélectionnés positivement au cours de l'évolution chez SAMHD1, incluant des régions différentes de celles impliquées dans l'interaction avec Vpx/Vpr, suggèrent fortement que SAMHD1 jouait un rôle sur d'autres pathogènes *(Laguette N et al., Cell Host Microbe, 2012 ; Lim ES et al., Cell Host Microbe, 2012, Zhang C et al., PLoS ONE, 2012).*

3) APOBEC3G

La famille des *APOlipoprotéine B Editing Catalytic subunit-like 3* possède 7 membres chez l'homme (APOBEC3A, B, C, DE, F, G et H) et chacune d'entre elle est caractérisée par la présence d'une cytidine déaminase (CDA) *(Harris RS et Liddament MT, Nat Rev Immunol. 2004)*. APOBEC3G (384 acides aminés et 46 kDa) est une protéine antivirale *(Sheehy AM et al., Nature, 2002)* mais d'autres APOBEC3 sont capables d'inhiber la réplication virale. Dans la plupart de cas, l'activité antivirale passe par l'incorporation des APOBEC3 dans la particule virale. Dans le cas d'APOBEC3G, la NC virale et les ARN viraux associés sont responsables de l'incorporation d'APOBEC3G dans les virions *(Malim MH et Bieniasz PD Cold Spring Harb Perspect Med. 2012)*. Lors de l'entrée du virus dans une nouvelle cellule cible, APOBEC3G exerce sa fonction de restriction pendant la transcription inverse, et plus particulièrement lors de la synthèse du brin d'ADN – *(Yu Q, Nat Struct Mol Biol, 2004)*. Les résidus cystéines présents dans le site actif permettent la déamination de la 2'-déoxycytidine produisant de la 2'-deoxyuridine. Une grande fraction des résidus cytidines (plus de 10%) peuvent être désaminés. APOBEC3G entraine donc des mutations majeures et nombreuses du génome viral, rendant sa réplication défectueuse.

La protéine virale Vif peut interagir avec un certain nombre d'APOBEC3 et peut recruter un complexe ubiquitine ligase composé de CUL5, ELOB, ELOC et RBX2 *(Yu X et al., Science, 2003)*. Des résultats récents de protéomique ont permis d'identifier le facteur de transcription *Core Binding Factor b* (CBFβ) comme un partenaire d'interaction de Vif, et qui s'associe également à l'enzyme E3 ligase, mais seulement en présence

de Vif *(Jager S et al., Nature, 2012 ; Zhang W et al., Nature, 2012)*. Le résultat de la polyubiquitinylation d'APOBEC3 entraine leurs dégradations *via* le protéasome 26S. Il s'agit d'un ancien moyen de contrecarrer ce facteur de restriction car tous les lentivirus apparentés, excepté *l'equine infectious leukemia virus*, expriment la protéine Vif et neutralisent les APOBEC3 de leurs hôtes respectifs *(Larue RS et al., J Virol, 2010)*.

C - Les facteurs de restriction des étapes tardives : BST-2/Tetherin

La protéine BST-2 (Tetherin, CD317, HM1.24) (180 acides aminés et 20 kDa) retient les particules virales matures à la membrane cellulaire *(Neil SJ et al., Nature, 2008 ; Van Damme M et al., Cell Host Microbe, 2008)*, à partir de laquelle elles peuvent être endocytées. Il s'agit du seul facteur de restriction parmi les 4 décris qui a une activité antivirale contre d'autres virus enveloppés, et appartenant à des familles différentes *(Evans DT, Trends Microbiol, 2010)*. Les mécanismes de restriction et les contre-mesures adoptées par le VIH sont détaillés dans la partie suivante.

IV – CONTRE-MESURES VIRALES LIEES A LA RESTRICTION DE BST-2 PAR VPU

A – Description des protagonistes

1) La protéine BST-2

La protéine BST-2 a initialement été identifiée par deux groupes indépendants, cherchant de nouveaux marqueurs de surfaces de lymphocytes B néoplasiques. Sa fonction cellulaire reste cependant méconnue mais BST-2 a été identifiée comme un facteur antiviral intrinsèque à la cellule, limitant la propagation du VIH-1 et d'autres virus, en retenant les particules virales matures à la membrane cellulaire. *(Neil SJ et al., Nature, 2008).*

a. Topologie de BST-2

Chez l'homme, le gène *bst-2* n'est présent qu'en une seule copie, sur le chromosome 19. Ce gène apparait comme étant non-polymorphique. Chez d'autres mammifères, des orthologues de *bst-2* existent, et un faible polymorphisme est retrouvé chez les singes de l'ancien monde. Ce gène *bst-2* encode pour une protéine de 180 acides aminés, d'environ 20 kDa. BST-2 est exprimée de manière constitutive dans un certain nombre de cellules telles que les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages. Dans les autres types cellulaires, l'expression de BST-2 peut être induite à l'interféron de type-I *(Blasius AL et al., J Immunol, 2006).*

Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II, présentant une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) à sa partie C-terminale, et une courte queue cytosolique à sa partie N-terminale (**Figure 17**).

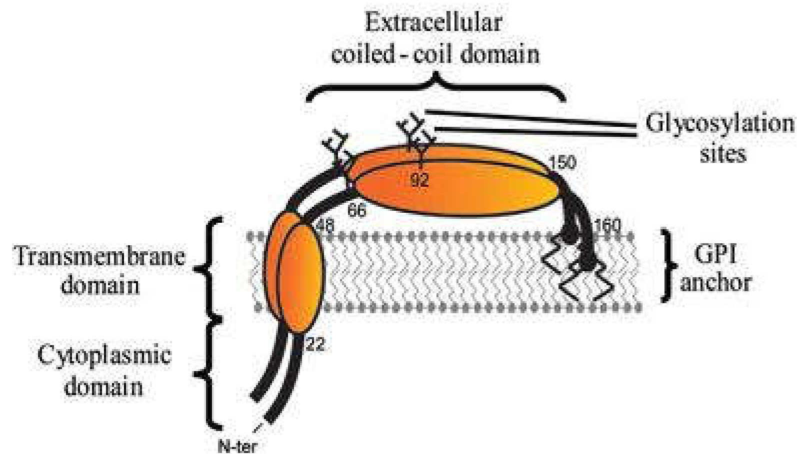


Figure 17: Représentation schématique de BST-2 *(Dubé M et al., Retrovirology, 2010).*

Cette topologie atypique de BST-2 lui permet une interaction avec les membranes des cellules ou des virions par ses deux extrémités. BST-2 se retrouve associé au niveau des radeaux lipidiques, riches en cholestérol, probablement grâce à son ancre GPI. *(Kupzig S et al, Traffic, 2003)*. BST-2 est retrouvée à la membrane plasmique et au niveau de membranes intracellulaires, notamment le *trans-Golgi Network* (TGN) et la voie endosomale. Contrairement aux autres protéines présentant des ancres GPI, BST-2 est endocyté de la surface cellulaire de façon clathrine-dépendante. Cette internalisation semble dépendre de la capacité de BST-2 à interagir avec la sous-unité α-adaptatine mais pas la sous-unité µ2 d'AP-2 *via* un motif di-tyrosine présent au niveau de sa partie cytosolique. *(Rollason R et al., J Cell Sci, 2007 ; Masuyama N et al., J Biol CHem, 2009).*
De plus, après son endocytose, BST-2 est acheminé par les endosomes précoces et transporté vers le TGN après l'interaction du son domaine cytosolique avec la sous-unité µ1 d'AP-1 *(Rollason R et al., J Cell Sci, 2007)*, suggérant que les complexes AP-1 et AP-2 agissent de façon séquentielles dans l'internalisation et l'acheminement de BST-2 vers le TGN. Bien que les résultats récents suggèrent que BST-2 recycle continuellement entre la membrane plasmique et le TGN avec une fraction dirigée vers les voies de dégradation, il reste encore à déterminer si la protéine peut également être recyclée du TGN à la surface cellulaire.

BST-2 peut former des homodimères *via* la formation de ponts disulfures entre les 3 résidus cystéines présent dans le domaine extracellulaire (**Figure 18**). Parmi toutes les protéines connues, cette topologie est relativement unique : il a seulement été observé une topologie similaire pour la protéine du prion. *(Hegde RS et al., Science, 1998).*

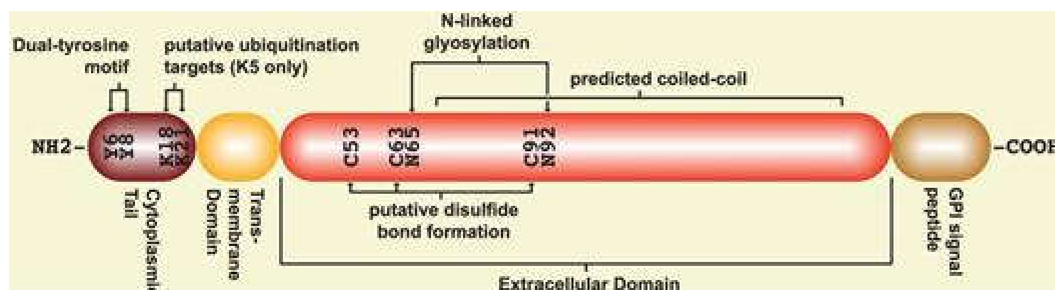


Figure 18. Topologie d'un monomère de BST-2 *(Evans DT et al., Trends Microbiol, 2010)*

b. Régulation transcriptionnelle de bst-2

Au niveau du promoteur du gène *bst-2*, on retrouve des éléments de réponse à l'interféron, et trois sites de liaison à STAT3, pouvant être activés en réponse à l'interleukine-6 (IL-6) *(Ohtomo T et al., Biochem Biophys Res Commun, 1999)*. En effet, la transcription de *bst-2* est augmentée dans la plupart des cellules après traitements à l'interféron de type I *(Neil SJ et al., Nature, 2008 ; Van Damme M et al., Cell Host Microbe, 2008 ; Kupzig S et al., Traffic, 2003 ; Ohtomo T et al., Biochem Biophys Res Commun, 1999 ; Blasius Al et al., J Immunol, 2006)*, appuyant la fonction conservée au cours de l'évolution de BST-2 dans l'immunité innée. De façon intéressante, BST-2 est capable d'inhiber la production d'interféron et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF-α (*Tumor Necrosis Factor*) dans les cellules dendritiques *(Cao W. et al., J Exp Med, 2009)*. Cette inhibition s'établit par la liaison de BST-2 au récepteur orphelin à l'ILT7 (*immunoglobulin-like transcript 7*), exprimé de façon constitutive dans les cellules dendritiques. Cette interaction entraine une boucle de rétrocontrôle négative.

2) La protéine Vpu

a. Description de Vpu

Le gène *vpu* est présent dans le génome du VIH-1 mais absent du VIH-2 et des autres SIV associés tels que SIV sooty mangabey (SIVsmm) et SIV rhésus macaque (SIVmac) *(Cohen EA et al., Nature, 1988 ; Strebel K et al., Science, 1988)*. Cependant, des homologues structurels ont été retrouvés chez les souches SIV chimpanzé (SIVcpz), SIV mona monkey (SIVmon), SIV spot-nosed monkey (SIVgsn) ou encore le SIV gorille (SIVgor) *(Barlow KL et al., J Virol, 2003 ; Courgnaud V et al., J Virol, 2002 ; Courgnaud V et al., J Virol, 2003 ; Dazza MC et al., J Virol, 2005 ; Takeshisa J et al., J Virol, 2009)*.

Le gène *vpu* est exprimé tardivement au cours de l'infection à partir d'un ARNm bicistronique dépendant de l'expression de Rev. Son ORF est localisée entre le premier exon des gènes *tat* et *env*. Vpu est une protéine transmembranaire de type I, de 81 acides aminés et de 16kDa. Les résidus 1 à 27, constituant la partie N-terminale, forment la partie hydrophobe de la protéine ancrée à la membrane plasmique (**Figure 19**). Cette partie est suivie de 54 acides aminés qui forment la partie cytosolique de la protéine. Il existe au sein de cette séquence une partie très conservée (acides aminés 47 à 58), contenant deux résidus sérines qui sont constitutivement phosphorylés par la caséine kinase de type II *(Schubert et al., J Mol Biol 1994)*. Par ailleurs,

l'état de phosphorylation des deux résidus sérines ne semble pas jouer de rôle dans la conformation de la protéine.

Des analyses de la structure tridimensionnelle de la partie C-terminale cytosolique de la protéine montrent la présence de deux hélices-α entre les acides aminés 35 à 50 et 58 à 70, séparées par une partie flexible contenant les résidus sérines phosphorylés *(Federau T et al., J Pept Protein Res, 1996).* Ces deux hélices de Vpu sont amphipathiques : elles sont constituées de résidus hydrophobes, basiques et acides regroupés le long de l'axe des hélices. Par résonnance magnétique nucléaire (RMN), il a été montré que le domaine transmembranaire de Vpu forme une structure hélicoïdale stable d'un angle compris entre 6° et 15° *(Kukol A et Arkin IT, Biophys J, 1999).* La région flexible comprise entre les deux hélices-α forme une boucle fuyant la membrane, probablement due à la nature acide des deux résidus sérines phosphorylés. *(Coadou G et al., Biochemistry, 2003).*

Vpu peut former des homopentamères lui conférant une structure de pores membranaires *(Grice AL et al., FEBS Lett, 1997).* Cette formation de pores membranaire a été vérifiée *in vitro*, et ces complexes pentamériques jouent le rôle de canal cationique. *(Ewart GD et al., J Virol, 1996)*

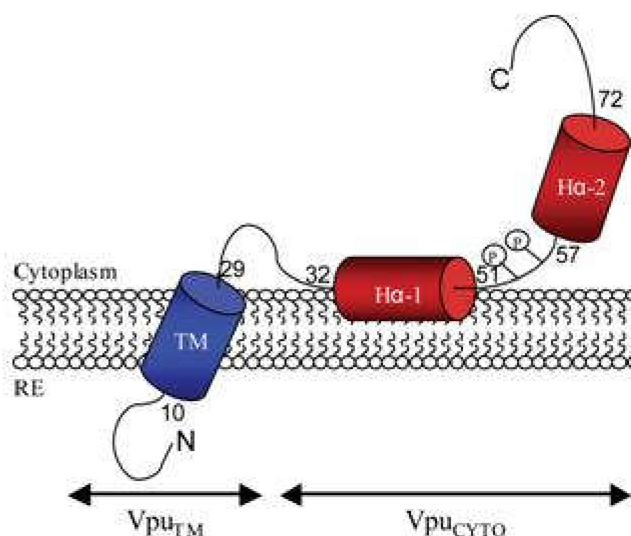


Figure 19: représentation schématique de Vpu *(Dubé M. et al., Retrovirology, 2010)*

b. Fonctions de Vpu

i. Vpu induit la dégradation de CD4

Trois protéines du VIH-1, Nef, Env et Vpu, contribuent à la libération des particules en modulant l'expression de surface de CD4. Il est intéressant de se demander pourquoi trois protéines virales sont nécessaires à la même fonction. Il a été suggéré que la diminution de l'expression de surface de CD4 contribue à limiter la surinfection des cellules par le virus mais ce phénomène reste débattu car il semblerait que ces surinfections augmentent les réarrangements génétiques viraux et confèreraient donc au virus un avantage évolutif.

Cependant, il a été montré que CD4 inhibe la libération de particules virales et interfère avec l'incorporation de la protéine Env *(Bour S et al., J Biol Chem, 1999)*. Quelque soit la finalité, il est clair la diminution de l'expression de CD4 est un problème majeur pour le VIH. De façon intéressante, Env, Nef et Vpu affectent l'expression de CD4 par 3 mécanismes différents. Nef est une protéine associée à la membrane, présente une ancre myristoylée dans sa partie cytoplasmique, capable de lier CD4 à la membrane cellulaire et entraine son internalisation *(Chaudhuri R et al., J Virol, 2007)*. Quant à Nef, cette protéine n'est pas capable d'empêcher le trafic de CD4 vers la membrane plasmique. Cette fonction est assurée par les protéines Env et Vpu qui, en retour, ne peuvent pas entrainer l'internalisation de CD4 à partir de la membrane plasmique. En effet, le précurseur de l'enveloppe gp160 interagit avec CD4 dans le RE et l'y retient *(Bour S et al., Microbiol Rev, 1995)*, alors que Vpu entraine la dégradation de CD4 *via* la voie protéasomale par un mécanisme impliquant le système de dégradation ERAD (*Reticulum Endoplasmic Associated Degradation*) *(Magadan JG et al., PLoS Pathog, 2010)*. La formation du complexe CD4-gp160 dans le RE bloque le transport et la maturation de CD4, mais également de Env lui-même *(Bour S et al., J Virol, 1991)*. Dans le cas ou la liaison entre CD4 et Env se ferait de façon équimolaire, cela pourrait conduire à la déplétion de Env à la surface cellulaire, ce qui aboutirait à la formation de virion non infectieux Env négatif *(Buonocore L et Rose JK, PNAS, 1993)*. La fonction de Vpu pourrait donc être d'entrainer la dégradation de CD4 présents dans ces complexes, permettant à la gp160 de reprendre son trafic à la membrane *(WIlley RL et al., J Virol, 1992)*. Dans les cellules exprimant Vpu, CD4 est rapidement dégradé dans le RE et sa demi-vie chute de 6h à 15min *(WIlley RL et al., J Virol, 1992)*. L'importance de la localisation de CD4 dans le RE suggère que les facteurs cellulaires importants se trouvent dans ce compartiment. Il a été montré que Vpu et CD4 interagissent directement dans le RE et que cette interaction est essentielle à la dégradation de CD4 *(Bour S et al., J Virol, 1995)*. Les domaines d'interactions entre Vpu et CD4 restent flous, mais les sérines 52 et 56 de Vpu jouent un rôle majeur dans cette dégradation *(Paul M et Jabbar MA, Virology, 1997)* mais pas dans l'interaction *Bour S et al., J Virol, 1995)*. Néanmoins, le domaine cytoplasmique de Vpu et CD4 sont nécessaires à l'interaction entre ces deux protéines (**Figure 20**) *(Margottin F et al., Virology, 1996)*. La phosphorylation des résidus sérines de Vpu est nécessaire à l'interaction Vpu et β-TrCp (*human β Tranducin-repeat Containing Protein*) *(Margottin F et al., Mol Cell, 1998)*, suggérant que β-TrCp est importante à la dégradation de CD4 par Vpu.

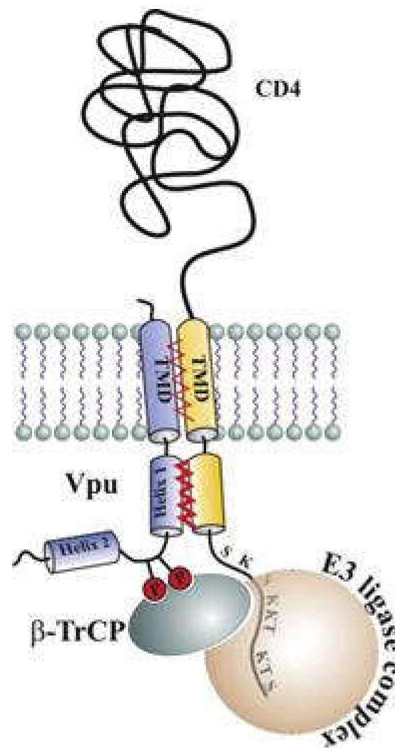


Figure 20: Mécanismes de régulation de l'expression de CD4 par Vpu. *(Andrew A and Strebel K, Mol Aspects Med, 2010)*

ii. Vpu favorise le détachement des virions à la membrane

La seconde fonction bien décrite de Vpu est la régulation de la libération des particules virales *(Strebel K et al., Science, 1988)*. De façon intéressante, cette capacité à favoriser la libération des particules virales n'est pas restreinte à Vpu : certaines souches de VIH-2 encode pour une protéine *Vpu-like* dans leurs glycoprotéines d'enveloppe *(Abada P et al., J Virol, 2005)*. On retrouve également cette activité *Vpu-like* portée par la protéine Nef de certaines souches SIV, incluant SIVmac et SIVagm *(Jia B et al., PLoS Pathog, 2009)*. Il est intéressant de noter que ce sont les trois mêmes protéines qui initialement avaient été caractérisées dans leurs capacités à moduler l'expression de CD4 qui sont également impliquées dans la libération des virions à la surface cellulaire. De même, chacune des trois protéines utilise une stratégie différente. Il semblerait également que les deux fonctions de Vpu sur CD4 et BST-2 soient distinctes.

B - Mécanisme de la restriction virale imposée par BST-2 et contrecarrée par Vpu

1) BST-2 retient les particules virales à la membrane plasmique

D'évidentes accumulations de BST-2 à la surface cellulaire préviennent la libération de particules virales matures via une rétention des particules virales à la membrane plasmique. Par ailleurs, des particules virales matures peuvent aussi être retrouvées dans des compartiments endosomaux intracellulaires *(Neil SJ et al., PLoS Pathog, 2006)*, suggérant qu'après l'étape de rétention à la membrane, les virions sont internalisés et probablement adressés vers les voies de dégradation *(Miyakawa K et al., PLoS Pathog, 2009)*. Des expériences

de microscopie électronique ont permis de déceler la présence de BST-2 entre les virions naissant et la membrane cellulaire, et également entre les virions eux-mêmes *(Hammonds J. et al., PLoS Pathog, 2010 ; Fitzpatrick K et al., PLoS Pathog, 2010)*. Par ailleurs, des expériences de biochimie et de microscopie électronique ont montré que BST-2 est incorporé dans les virions *(Habermann A et al., J Virol, 2010 ; Perez-Caballero et al., Cell, 2009 ; Hammonds J. et al., PLoS Pathog, 2010 ; Fitzpatrick K et al., PLoS Pathog, 2010)*. De plus, la structure de BST-2 plus que sa séquence peptidique elle-même semble responsable de cette aptitude à lier les virions ensemble et à la membrane plasmique. Même si de fortes évidences appuient le modèle selon lequel BST-2 retient directement les virions, la topologie précise de BST-2 n'est pas connue **(Figure 21)**.

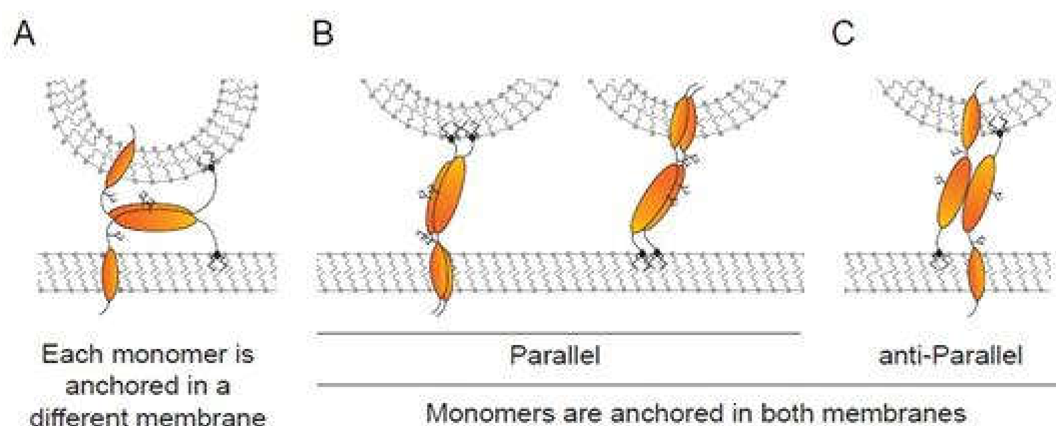


Figure 21 : Modèles de rétention et d'incorporation des virions par BST-2. A : Interactions de dimères de BST-2 *via* ses domaines extracellulaires. Une molécule de BST-2 est ancrée à la membrane virale, et l'autre à la membrane cellulaire. B : Rétention par BST-2 assemblés en dimères parallèles. 2 configurations montrées : les ancres GPI sont ancrées dans la membrane virale et les domaines transmembranaires à la membrane virale ou inversement. C : les deux types d'ancres d'un homodimère de BST-2 antiparallèle sont arrimés aux membranes *(Dubé M et al., Retrovirology, 2010)*.

Cependant, la déplétion de l'ancre GPI ou de la queue cytoplasmique supprime la capacité antivirale de BST-2 *(Perez-Caballero D et al., Cell, 2009 ; Neil SJ et al., Nature, 2008)*, appuyant le modèle suivant lequel BST-2 forme un homodimère parallèle avec une ancre reliant la membrane cellulaire et l'autre ancre dans la membrane virale (**Figure 21 Modèle B**).

Le domaine extracellulaire de BST-2 contient deux sites de N-glycosylations, trois résidus cystéines et un domaine coiled-coil intervenant dans sa dimérisation. Les glycosylations de BST-2 sont importantes dans son trafic dans la cellule et probablement dans sa conformation (*Perez-Caballero D et al., Cell, 2009)* mais ne semblent pas importante dans l'activité antivirale de BST-2 *(Sakuma T et al., J Virol, 2009 ; Perez-Caballero D et al., Cell, 2009 ; Andrew AJ et al., Retrovirology, 2009)*. Cependant, les résidus cystéines dans le domaine extracellulaire sont nécessaires à la restriction imposée sur le VIH-1 sans affecter le trafic de BST-2 à la surface cellulaire (*Perez-Caballero D et al., Cell, 2009 ; Andrew AJ et al., Retrovirology, 2009)*. Il n'est pas clair si les extrémités GPI ou transmembranaire des dimères parallèles de BST-2 ont une préférence d'ancrage pour les membranes virales et cellulaire ont une préférence pour l'extrémité GPI ou transmembranaire de

BST-2 (*Perez-Caballero D et al., Cell, 2009)*. Alors que ce modèle est consistant avec la topologie de BST-2, il pose encore des problèmes. Premièrement, le traitement des particules virales attachées par une enzyme clivant les ancres GPI, la phosphatidyl inositol phospholipase C (Pi-PLC) ne permet pas le détachement des virions de la surface cellulaire (*Fitzpatrick K et al., PLoS Pathog, 2010*). Deuxièmement, basé sur des données structurelles, la distance maximale qui peut relier BST-2 dans la conformation mentionnée en **figure 21B** est d'environ 17nm *(Hinz A et al., Cell Host Microbe, 2010 ; Schubert HL et al., PNAS, 2010 ; Yang H et al., PNAS, 2010*). Cependant, la distance entre la membrane plasmique et la membrane virale qui a pu être mesurée par microscopie électronique est bien plus grande (*Fitzpatrick K et al., PLoS Pathog, 2010* ; *Hammonds J. et al., PLoS Pathog, 2010)*. Un modèle alternatif à la rétention virale serait que des monomères de BST-2 seraient ancrés par les deux extrémités à la membrane virale ou à la membrane plasmique, mais associés les uns aux autres en dimères (**Figure 21A**). Même si ce modèle explique la nécessité de dimérisation de BST-2, il n'explique pas pourquoi les régions N-terminale et GPI sont requises (*Perez-Caballero D et al., Cell, 2009 ; Neil SJ et al., Nature, 2008)*. Par ailleurs, dans ce modèle, BST-2 retiendrait les particules virales à une distance de 3-5nm, incompatibles avec les mesures observées en EM.

2) Effets de BST-2 sur la transmission cellule-cellule

Des expériences récentes suggèrent que le VIH-1 peut se disséminer directement a travers les lymphocytes T en formant des structures polarisées au sein de la cellule appelées « synapse virologique », dans lesquelles les virions sortants sont recrutés dans des zones de contacts privilégiées entre cellules non infectées et cellules infectées *(Jolly C et al., Traffic, 2004 ; Mothes W et al., J Virol, 2010)*. Alors que l'on observe une accumulation de virions à la surface cellulaire, il n'est pas clair si le transfert de ces virions *via* les synapses virologiques est diminué, ou si BST-2 restreint ce mode de transmission. Il a récemment été reporté que BST-2 diminue la transmission entre une cellule donneuse (HeLa, cellules T) et un lymphocyte T sans empêcher la formation de la synapse virologique (*Casartelli N et al., PLoS Pathog, 2010*). De façon intéressante, en présence de BST-2, des virus ΔVpu sont accumulés au niveau de la synapse virologique et sont transférés à la cellule cible sous formes d'agrégats anormaux. Ces agrégats de virus sont incapables de fusionner avec la cellule cible et ne conduisent pas à une infection productive de virus. Ces résultats sont contradictoires avec ceux d'une autre équipe qui a montré que BST-2 ne restreint pas le transfert de virus ΔVpu entre deux cellules T (*Jolly C et al., J Virol, 2010*). Au contraire, dans cette étude, il semblerait que BST-2 augmente le transfert de cellule à cellule de virus ΔVpu, en modulant l'accumulation de virus à la membrane et l'intégrité de la synapse virologique. Ces résultats sont en accord avec des tests *in vitro* montrant lors de transmission cellule-cellule entre lymphocytes T l'émergence de variants de VIH-1 présentant des mutations dans les gène *env* et *vpu* (*Gummuluru S et al., J Virol, 2000*).

3) Riposte virale sur la restriction induite par BST-2

Les mécanismes par lesquels Vpu contrecarre l'activité antivirale de BST-2 ont attiré l'attention depuis la découverte du facteur de restriction. La première observation sur les contre-mesures de Vpu consiste en une diminution de l'expression de surface de BST-2 (*Van Damme M et al., Cell Host Microbe, 2008*). Cette diminution de l'expression de surface de BST-2 est corrélée avec une augmentation de la libération des particules virales. Cependant, les mécanismes mis en jeu restent à être élucidés (*Miyagi E et al., PNAS, 2009*). La diminution d'expression de BST-2 à la membrane plasmique prévient la liaison des membranes cellulaire et virale, entrainant une libération plus importante de virus exprimant Vpu. Bien que cette notion soit supportée par une diminution de la colocalisation de BST-2 et Gag en présence de Vpu (*Neil SJ et al., Nature, 2008* ; *Jouvenet N et al., J Virol, 2009 ; Mitchell RS et al., PLoS Pathog, 2009*), des analyses biochimiques ont révélées que l'expression de Vpu diminue partiellement la présence de BST-2 dans les particules virales relâchées (*Perez-Caballero D et al., Cell, 2009 ; Hammonds J. et al., PLoS Pathog, 2010* ; *Fitzpatrick K et al., PLoS Pathog, 2010*). Par ailleurs, des expériences d'EM montrent que les virions produits de cellules exprimant BST-2 incorporent quand même BST-2 à des quantités moindre *(Habermann A et al., J Virol, 2010 ; Fitzpatrick K et al., PLoS Pathog, 2010*). Ces résultats suggèrent qu'il doit exister un seuil de niveau d'expression de BST-2 nécessaire à l'établissement d'une restriction antivirale ou que BST-2 doit être retiré de microdomaines spécifiques de la membrane plasmique pour permettre la propagation virale. Dans cette idée, il a été supposé que Vpu permettrait une meilleur libération des particules virales en enlevant BST-2 des sites d'assemblages et de bourgeonnements viraux (*Habermann A et al., J Virol, 2010).* De façon intéressante, des études récentes ont montré que la présence de Vpu au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique augmenterait la libération des particules virales (*Ruiz A et al., Virology, 2010*). Il serait important de déterminer si Vpu module l'expression de BST-2 à des endroits spécifiques de la membrane plasmique ou si cet antagonisme se fait indépendamment de sa localisation à la surface cellulaire.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la façon dont Vpu diminue l'expression de BST-2 à la surface cellulaire et donc inhibe sa restriction sur la libération des particules virales. Cela inclus une dégradation protéasomale ou endo-lysosomale du facteur de restriction et/ou l'altération de son trafic à la surface cellulaire, entrainant sa séquestration intracellulaire. Bien que ces mécanismes soient distincts, ils reposent sur la capacité de Vpu à interagir avec BST-2. En effet, la restriction imposée par BST-2 sur la libération de particules virale peut être restaurée par mutation de certains résidus de Vpu abrogeant ces interactions (*Douglas JL et al., J Virol, 2009 ; Dube M et al., PLoS Pathog, 2010 ; Rong L et al., J Virol, 2009 ; IwabuY et al., J Biol Chem, 2009 ; Mangeat B et al., PLoS Pathog, 2009*). Des résidus importants ont été déterminés et sont localisés dans les parties transmembranaires des deux protéines, suggérant que ces deux protéines interagissent *via* leurs domaines transmembranaires *(Vigan R et al., J VIrol, 2010 ; Kobayashi T et al., J Virol, 2010 ; Banning C et al., PLoS ONE, 2010*). Les mécanismes proposés pour l'action de Vpu sur BST-2 sont détaillés après.

L'expression de Vpu entraine une diminution de la quantité globale de BST-2 dans la cellule (*Mitchell RS et al., PLoS Pathog, 2009 ; Douglas JL et al., J Virol, 2009 ; Goffinet C et al., Cell Host Microbe, 2009).* Cette déplétion se met en place à un moment post-transcriptionnel car les niveaux d'ARNm de BST-2 ne sont pas affectés par Vpu (*Douglas JL et al., J Virol, 2009 ; Mangeat B et al., PLoS Pathog, 2009).* Par ailleurs, des expérience de *pulse-chase* indiquent que Vpu diminue la demi-vie de BST-2 endogène (*Goffinet C et al., Cell Host Microbe, 2009 ; Douglas JL et al., J Virol, 2009 ; Dube M et al., PLoS Pathog, 2010).* De la même manière qu'il a été observé sur la dégradation de CD4 par Vpu, le recrutement de β-TrCp semble requis pour la dégradation de BST-2 induite par Vpu, car l'utilisation d'un mutant Vpu2.6 (Vpu muté sur les résidus S52 et S56) ne modifie pas la demi-vie de BST-2 (*Douglas JL et al., J Virol, 2009 ; Dube M et al., PLoS Pathog, 2010).* Les mécanismes détaillés sur la dégradation de BST-2 par Vpu seront détaillés en partie **V-C.**

C – Restriction par BST-2 chez les autres virus

Les virus co-évoluant avec leurs hôtes, il n'est pas surprenant que le VIH-1 ait su mettre en place des contre-mesures liées à la restriction par BST-2. De la même façon, nous pouvons nous demander si les autres virus infectant l'homme en ont fait autant. Il a en effet été montré que BST-2 inhibe également la libération d'un grand nombre de virus enveloppés, tels que le VIH-2, le SIV, le virus Ebola ou encore le KSHV, et que ces virus possèdent des outils permettant de lever cette restriction.

1) VIH-2

A l'opposé du VIH-1, le VIH-2 ne code pas pour une protéine Vpu. Cependant, ces souches virales sont tout de même capables de diminuer l'expression de surface de BST-2. Les résidus T598 présent dans la partie extracellulaire de la glycoprotéine d'enveloppe gp41 et les motifs GYXXθ présent dans la queue cytoplasmique de la gp41, sont impliqués dans ce processus *(Douglas JL et al., J Virol, 2009).* D'autres mutations, empêchant un *processing* correct de l'enveloppe, altèrent également la propagation virale et la capacité du virus à diminuer l'expression de surface de BST-2 *(Le Tortorec A et al., J Virol, 2009)*. D'un point de vue mécanistique, il a été montré que la protéine VIH - 2 Env coimmunoprécipite avec BST-2. Cependant, à la différence de Vpu, il semblerait que la levée de la restriction de BST-2 par VIH-2 Env ne passe pas par une dégradation du facteur de restriction. Il a été suggéré que BST-2 serait séquestré dans le TGN en présence de VIH-2 Env, suggérant que ce mécanisme de séquestration protéique permettrait une augmentation de la propagation virale. A noter que de façon intéressante la protéine VIH-2 Env est également capable de diminuer l'expression du BST-2 Rhésus, ce qui suggère que les fonctions de VIH-2 Env puissent franchir la barrière d'espèces *(Jia B et al., PLoS Pathog, 2009).*

2) SIV

Tout comme le VIH-2, la plupart des souches SIV ne code pas pour un homologue de Vpu. Par ailleurs, de récentes études montrent que la déplétion du gène *env* du SIV n'inhibe pas la libération des particules virales chez le SIVmac dans des cellules exprimant BST-2 Rhesus *(Zhang F et al., Cell Host and Microbe, 2009)*. En fait, la modulation de l'expression de rhBST-2 dans ces cellules est effectuée par la protéine Nef du SIV. Cette inhibition apparait comme spécifique à l'espèce : les protéines Nef des souches SIV contrecarrent effectivement les protéines BST-2 de leurs hôtes respectifs, mais sont incapables de contrecarrer le BST-2 humain. C'est également le cas pour les virus SIVgor et SIVcpz malgré le fait qu'ils expriment une protéine orthologue à Vpu *(Sauter D et al., Cell Host and Microbe, 2009)*. De façon intéressante, les protéines Nef des VIH-1 et VIH-2 semblent avoir perdus cette fonction car ne peuvent contrecarrer la protéine BST-2 humaine. Cependant, ces protéines HIV-1 Nef et HIV-2 Nef gardent une certaine activité contre le rhBST-2. Des études ont montré l'importance de 5 acides aminés (GDIWK) présents dans le domaine cytosolique de rhBST-2 nécessaire dans l'activité de SIVmac Nef, résidus absents de la queue cytosolique de hBST-2. D'autres analyses par mutagénèse ont montrés que le site de myristoylation de Nef et que le motif de reconnaissance au cholestérol sont important dans la capacité de Nef à contrecarrer rhBST-2, mettant en avant l'importance de la localisation membranaire de Nef.

3) Filovirus

L'inhibition de la propagation virale chez le virus Ebola a permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle de restriction de BST-2 chez une famille de virus autre que les *Lentividae* Vpu *(Neil SJ et al., Cell Host and Microbe, 2007)*. Il a était mis en évidence que la glycoprotéine d'Ebola (GP) permet de restaurer une propagation efficace des particules virales dans des cellules exprimant BST-2. Au contraire de Vpu ; la protéine GP d'Ebola est capable de contrecarrer la protéine BST-2 chez l'homme mais également chez la souris, mettant en avant l'absence de spécificité d'espèce pour cette protéine. Le mécanisme par lequel la protéine GP interfère avec BST-2 ne semble pas être lié à la dégradation du facteur de restriction, mais plus à une relocalisation cellulaire.

4) KSHV

Le virus du Syndrome de Kaposi reste pour l'instant le seul exemple de virus à ADN capable de contrecarrer la restriction imposée par BST-2. Dans un crible réalisé pour identifier de nouvelles cibles de l'ubiquitine ligase kK5 du KSHV, il a été observé une diminution de l'expression de BST-2 *(Mansouri M et al., J Virol, 2009)*. En effet, l'ubiquitinylation de BST-2 est augmentée en présence de la protéine kK5, entrainant son endocytose et sa dégradation par la voie lysosomale. L'ubiquitinylation de BST-2 se fait au niveau de deux résidus lysines présents dans sa partie cytosolique, et des mutations sur ces résidus confèrent une résistance à la dégradation de BST-2 par kK5. Cependant, les mécanismes exacts de restriction imposés par BST-2 restent

à être déterminer étant donné que la propagation des virus Herpes ne s'effectue pas par un bourgeonnement des particules virales à la membrane plasmique, mais par des transports vésiculaires.

V – LE PROCESSUS D'UBIQUITINYLATION ET SON IMPLICATION DANS LE CYCLE REPLICATIF DU VIH-1

A – Généralités sur l'ubiquitinylation

1) La voie de l'ubiquitinylation

L'ubiquitine est un signal cellulaire qui marque les protéines d'une manière extrêmement contrôlée. La conjugaison de l'ubiquitine à une protéine cible ou à elle-même est régulée par l'action séquentielle d'une enzyme d'activation de l'ubiquitine (*ubiquitin-activating*) ou E1, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (*ubiquitin-conjugating*) ou E2, et une enzyme de liaison de l'ubiquitine (*ubiquitin ligase*) ou E3. Cette réaction d'ubiquitinylation consiste en la liaison d'une molécule d'ubiquitine *via* le groupement aminé ε d'une lysine à l'extrémité N-terminale d'un polypeptide **(Figure 22)** (*Hershko A & Ciechanover A, Annu Rev Biochem, 1998 ; Varshavsky A, Trends Biochem Sci, 1997 ; Pickart CM & Eddins MJ, Biochim Biophys Acta, 2004*).

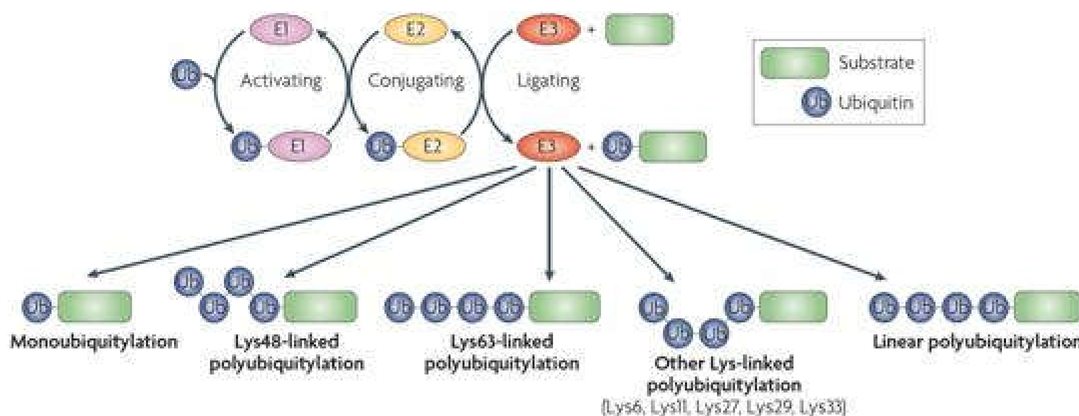


Figure 22: Cascade enzymatique conduisant à l'ubiquitinylation d'un substrat. L'activité de 3 enzymes est requise à l'ubiquitinylation : E1, E2 et E3 qui reconnait le substrat. L'achèvement d'un cycle d'ubiquitinylation conduit à un substrat monoubiquitinylé. Cependant, ce cycle peut être répété pour former des substrats polyubiquitinylés.

Les chaines d'ubiquitine peuvent s'agrandir tant que les enzymes E2 et E3 catalysent la formation d'une liaison isopeptidique entre le groupement carboxyle de la Gly76 d'une molécule d'ubiquitine et le groupement aminé ε d'une lysine d'une autre molécule d'ubiquitine. L'ubiquitine est une protéines de 76 acides aminés comprenant 7 résidus Lys (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 et Lys63) (**Figure 23**), permettant théoriquement 7 types de liaisons homotypiques et une multitude de types de liaisons hétérotypiques (*Ikeda F & Dikic I, EMBO rep, 2008*). Par conséquent, les protéines cellulaires sont susceptibles d'être modifiées par une grande diversité de signaux d'ubiquitine : monoubiquitinylation, multiples monoubiquitinylations,

chaines d'ubiquitine pouvant être de diverses longueurs et faites de différentes liaisons (*Ikeda F & Dikic I, EMBO rep, 2008*).

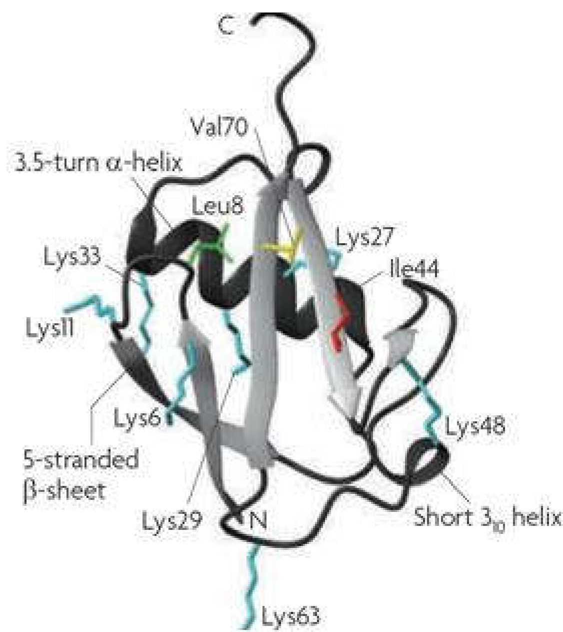


Figure 23: représentation 3D d'une molécule d'ubiquitine. (Protein Data Bank identifiant 1D3Z). L'ubiquitine contient 5 feuillets β, une hélice α d'un pas de 3.5° et une courte hélice 3_{10}. Sept résidus lysines sont exposés (bleu) et accessibles à la formation de chaines d'ubiquitine. Les résidus hydrophobes Leu8 (vert), Ile44 (rouge) et Val70 (jaune) servent de plateformes à de nombreux domaine de liaison à l'ubiquitine (*ubiquitin binding domaine, UBD*).

Alors que l'addition d'une seule molécule d'ubiquitine (monoubiquitinylation) sur une protéine cible peut modifier son activité et/ou sa localisation (en régulant l'endocytose, l'adressage vers les lysosomes, impliquée dans la méiose ou encore dans le remodelage de la chromatine), les formations de diverses chaines d'ubiquitine sont impliqués dans des processus tels que l'adressage vers les voies protéasomales 26S ou lysosomales, la signalisation cellulaire, ou encore la réparation de l'ADN.

2) L'ubiquitine et ses apparentés

L'ubiquitinylation est considérée comme l'une des plus importantes modifications post-traductionnelles de l'évolution (*Hochstasser M, Nature, 2009*). Il existe des protéines relativement proches de l'ubiquitine, appelées *ubiquitin-like* ou Ubl telles que les protéines SUMO, NEDD8, ATG8, ATG12 ou ISG15 (**Figure 24).** Les modifications subies des protéines cibles par des Ubl sont effectuées *via* des cascades enzymatiques similaires à celles utilisées pour la liaison d'ubiquitine. Les Ubl sont cependant activées par des E1 spécifiques et sont transférées de leur substrat à l'E2. Les rôles des E3 dans la fixation de Ubl à la protéine cible sont moins clairs. Dans la majorité des cas, aucune E3 n'est requise, et les E2 sont souvent capables d'interagir directement avec la protéine cible. Cependant, les E3 de NEDD8 (*Neuronal-precursor-cell-*

expressed developmentally downregulate protein 8) et SUMO ont été découvertes (*Xirodimas DP et al., Cell, 2004 ; Kotaja N et al., Mol Cell Biol, 2002*).

Ubiquitin-like protein*	Sequence identity to ubiquitin (%)	Substrate(s)	Attributed function(s)
NEDD8 (Rub1)	58	Cullins, p53, MDM2	Regulation of E3s
SUMO-1 (Smt3)	18	Many	Nuclear localization, transcriptional regulation, antagonizing ubiquitylation
SUMO-2 and -3	16	C/EBPβ1, topoisomerase II	Transcriptional regulation, mitosis
ISG15/UCRP‡	29, 37	PLCγ1, JAK1, STAT1, ERK1/2, serpin 2a	Immune responses, interferon signal transduction
FAT10‡	29, 36	Unknown	Apoptosis, cytokine signal transduction
FUB1	37	TCR-α-like protein, Bcl-G	T-cell activation
UBL5 (Hub1)	22	Unknown	Pre-mRNA splicing
URM1	12	Ahp1	Oxidative stress response, nutrient sensing (through the TOR signalling pathway)
ATG8	10	Phosphatidylethanolamine	Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting
ATG12	17	Atg5	Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting

Figure 24: table des Ubl chez l'Homme et homologues chez *S. cerevisiae*. (*Welchman RL et al., Nat Rev Mol Biol Cell, 2005*)

Le marquage des protéines par une Ubl ne les oriente généralement pas vers les voies de dégradation, mais jouerait davantage un rôle dans l'activation de la transcription de gènes ainsi que dans leur localisation subcellulaire et leur stabilité.

4) Les enzymes de la voie de l'ubiquitine

a. Les enzymes E1

L'attachement des molécules d'ubiquitine à leur cible est réalisé *via* des cascades multienzymatiques et joue un rôle central dans la modulation fonctionnelle des protéines. Dans la première étape de l'activation, l'enzyme E1 lie une molécule de MgATP et d'Ub, permettant l'acyl-adénylation de l'extrémité C-terminale de l'Ub. Dans la seconde étape, le groupement cystéine de l'E1 attaque l'ubiquitine-adénylée pour alors former le complexe activé E1-Ub *via* une liaison thiolester très énergétique entre la partie carboxy-terminale de l'Ub et la machinerie de conjugaison. Par la suite, une seconde molécule d'Ub est adénylée et se lie à un site différent de la même E1. Enfin, l'E1 lie d'une à plus de 10 enzymes E2 apparentées permettant le transfert d'une des deux molécules d'Ub à l'E2 afin d'initier la cascade enzymatique. Cette liaison se fait généralement sur le groupement ε-amino-terminal d'une lysine de l'E2. La spécificité de l'ubiquitinylation est réalisée au niveau des enzymes E2 et E3 chez lesquelles ont été identifiées une cinquantaine d'E2 et plusieurs centaines d'E3. Cependant, seulement deux enzymes E1 pour l'ubiquitine sont connues à ce jour (*Schulman BA & Harper JW, Nat Rev Mol Cell Biol, 2009*).

b. Les enzymes E2

L'enzyme E2 est responsable de la sélection de l'E3 ligase et de la modification du substrat, ce qui en fait un élément central dans le transfert de l'ubiquitine et dans la diversité de voies de signalisation de l'ubiquitine. A ce jour, une cinquantaine d'enzymes E2 a été cristallographiée, seule ou dans des complexes protéiques, donnant ainsi de nombreuses informations sur les interactions entre E2 et protéines partenaires.

La première tâche importante pour une enzyme E2 est de recevoir l'Ub, mais pas les Ubl, sur son site actif. Les Ubl présentent de nombreuses homologies structurelles avec l'Ub et elles sont également conjuguées au substrat *via* un résidu lysine grâce à l'action spécifique d'E1, E2 et E3. Bien que les E1 et E2 pour les Ubl aient des structures similaires à celles des enzymes correspondantes pour l'Ub, les E2 d'Ub interagissent de manière spécifique avec les 2 E1 de la voie d'Ub. En général, les E2 lient les E1 avec une grande affinité seulement si l'E1 à été préalablement modifiée. (*Schulman BA & Harper JW, Nat Rev Mol Cell Biol, 2009 ; Haas AM et al., J Biol CHem, 1988*). Des études structurelles ont révélées que la liaison d'une E1 avec l'Ub entraine des changements conformationnels importants de l'E1 et permet l'exposition de sites de liaison pour permettre la formation du complexe E1-E2 (*Lois LM & Lima CD, EMBO J, 2005 ; Lee I & Schindelin H, Cell, 2009*). Lors de ces réarrangements, un sillon de l'E1 contenant des acides aminés chargés négativement est mis à jour et permet la reconnaissance de deux résidus Lys très conservés présents dans l'hélice-α de toutes les E2 Ub mais absents chez les E2 Ubl.

Toutes les E2 caractérisées reconnaissent les E3-ligases *via* les boucles L1 et L2 et l'hélice-α en partie N-terminale de l'E2. D'infimes variations dans ces motifs peptidiques contribuent à la spécificité de leur liaison avec l'E3. Par exemple, l'E2 UBE2L3 utilise les Pro62 et Phe63 de la boucle L1 pour interagir avec l'E3 *casitas B-lineage lymphoma* (v-Cbl), un pro-oncogène qui régule négativement la voie de signalisation de certaines tyrosine-kinases (*Dominguez C et al., Structure, 2004*). Les interactions entre E2 et E3 sont souvent faibles. Même si ces faibles interactions entre les domaines HECT ou RING des E3 ont lieu loin du site actif de l'E2, la liaison de l'E3 est nécessaire à l'activité de l'E2. En fait, certaines E3 peuvent augmenter l'efficacité de transfert d'Ub de l'E2 à l'E3 (*Ozkan E et al., PNAS, 2005 ; Das R et al., Mol Cell, 2009 ; Wu PY et al., EMBO J, 2003*).

La faible affinité des E2 pour les E3 est probablement un avantage pour la formation des chaines d'Ub car les E2 utilisent des domaines communs pour interagir avec les E1 et les E3 (*Huang DT et al., Mol Cell, 2005 ; Eletr ZM, Nat Struct Mol Biol, 2005*). Par conséquent, une E2 ne peut pas être rechargée par une E1 lorsqu'elle est liée à une E3, et doit par conséquent se dissocier et s'associer de nouveau afin de permettre l'élongation des chaines d'Ub. Une fois dissociées, le rechargement des E2 s'effectue très rapidement car la majorité des E2 présentes dans la cellule sont déjà chargées avec de l'Ub (*Jin J et al., Nature, 2007 ; Soucy TA et al., Nature, 2009*).

Comme précisé auparavant, certaines E2 augmentent leurs capacité à stimuler la formation des chaines d'Ub *via* la reconnaissance de sites additionnels présents sur leurs E3, sites distincts des domaines HECT ou RING. Il a été suggéré que certains sites de liaisons à l'E3 permettent de désengager l'E2 d'un domaine RING pour

permettre son rechargement tout en restant associer à l’E3. Par ailleurs, les sites de liaisons indépendant des domaines RING peuvent augmenter la cinétique de liaison entre l’E2 et l’E3 après avoir été chargée par une E1.

c. Les enzymes E3

Les enzymes E3 catalysent la réaction finale de la cascade enzymatique d’ubiquitinylation. Elles doivent être capables de reconnaitre les résidus lysines présents sur le substrat, et de les préparer à recevoir l’Ub.
Pour les E3 ubiquitine ligases appartenant à la famille des *homologous to the E6AP carboxyl terminus* (HECT) (*Rotin D & Kumar S, Nat Rev Mol Cell Biol, 2009*), il y a nécessité de formation d’une liaison thiolester intermédiaire entre l’Ub apportée par l’E2 et la cystéine du site actif de l’E3. Mais la majorité des E3 appartient au groupe des *really interesting new gene* (RING) (*Deshaies RJ & Joazeiro CA, Annu Rev Biochem, 2009*). Ces dernières catalysent le transfert direct de l’Ub de l’E2 au substrat (**Figure 25)**. La molécule d’Ub peut également être liée à la partie N-terminale des protéines (*Ciechanover A & Ben Saadon R, Trends Cell Biol, 2004*) et sur d’autres résidus aminés tels que les cystéines, thréonine et sérine (*Cadwell K & Coscoy L, Science, 2005 ; Shimizu Y et al., Mol Cell, 2010 ; Tait SW et al., J Cell Biol, 2007 ; Wang X et al., J Cell Biol, 2007 ; Williams C et al., J Biol Chem, 2007*).

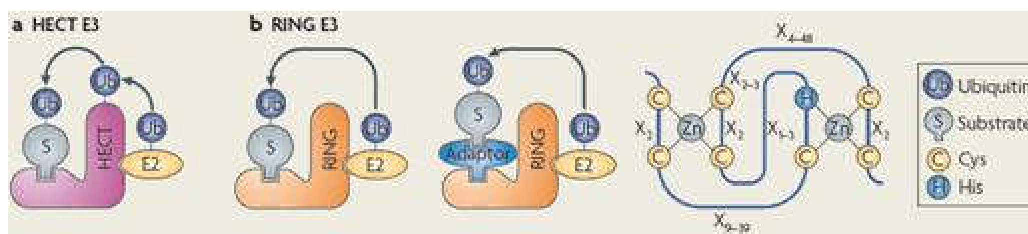


Figure 25: Les deux principaux groupes d’E3 connues : les HECT-E3 et RING-E3. Ces deux catégories diffèrent par la méthode de transfert de l’Ub sur le substrat. **A :** Les HECT-3 sont des enzymes contenant une cystéine conservée dans leur site catalytique, qui joue le rôle d’adaptateur entre l’E2 et le substrat. **B :** La majorité des E3 sont des RING-E3. Elles sont caractérisées par une séquence $CX_2CX_{9\text{-}39}CX_{1\text{-}3}HX_2(C/H)X_2CX_{4\text{-}48}CX_2$ formant une structure en croix permettant la liaison de deux atomes de Zinc *via* des résidus Cys et His. (*Rotin D & Kumar S, Nat Rev Mol Cell Biol, 2009*)

Dans les deux parties suivantes sont décrites les deux grandes familles d’E3 ubiquitine ligase chez l’homme ainsi que certains de leurs membres. Les exemples cités soulignés ont été décrits comme impliqués dans la voie endosomale, dans l’ubiquitinylation de protéines membranaires ou sont impliqués dans le cycle réplicatif du VIH-1, et elles seront utilisées lors des expériences.

i) Les enzymes HECT-E3

Chez les mammifères, il existe une trentaine d’E3 à domaines HECT. Parmi leurs nombreuses fonctions, les HECT-E3 jouent un rôle prédominant dans le trafic protéique, la réponse immune et dans diverses signaux qui régulent la croissance cellulaire et la prolifération (*Rotin D & Kumar S, Nat Rev Mol Cell Biol, 2009*). Le

domaine conservé HECT comprend environ 350 acides aminés et est localisé dans la partie C-terminal de ces enzymes, alors que le domaine N-terminal contient divers signaux d'interaction protéine-protéine ou protéine-lipide. Les HECT-E3 ont été décrites pour la première fois chez la protéine E6 du Papilloma Virus Humain (HPV) (*Hicke L & Dunn R, Annu Rev Cell Dev Biol, 2003*). Les 28 HECT-E3 humaines peuvent être divisées en trois groupes suivant leur domaine N-terminal : La famille Nedd-4 (9 membres), la famille HERC (6 membres) et les autres HECT (13 membres) (**Figure 26**)

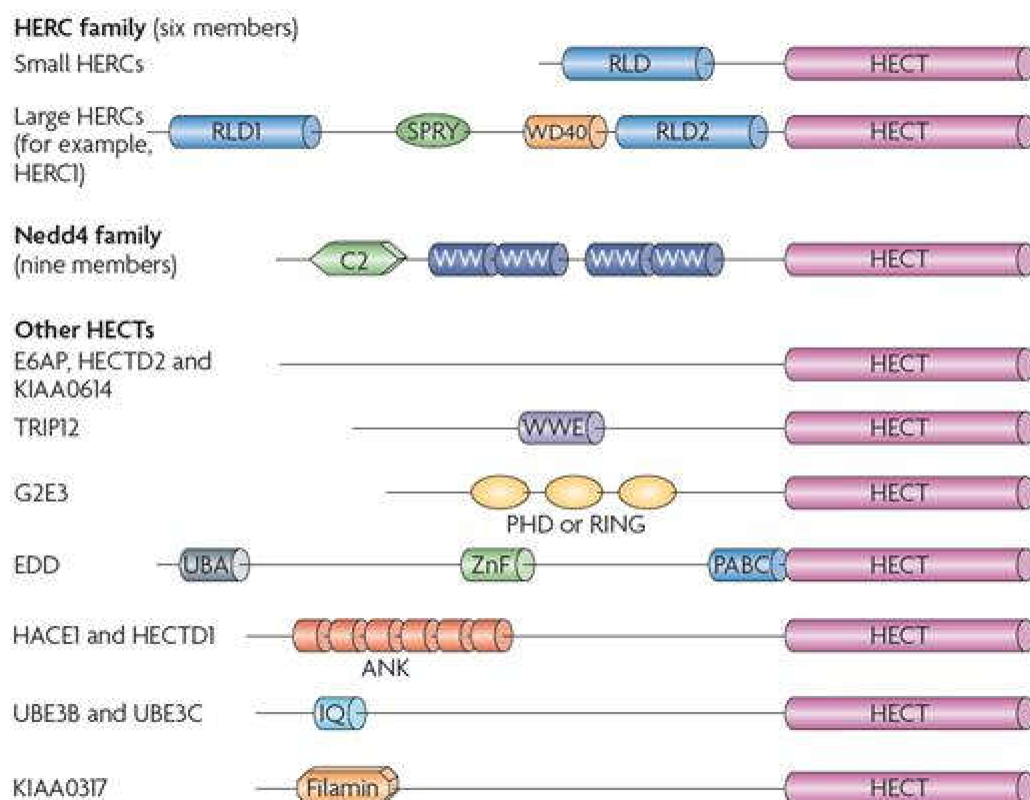


Figure 26: Les HECT-E3 ubiquitine ligases chez les mammifères. Les 28 HECT-E3 ont été regroupées en 3 familles. Deux d'entres elles, la famille Nedd4 et HERC peuvent être clairement distinguées grâce à l'architecture de leurs domaines structuraux. ANK: ankyrine; PABC, PABP (Poly(A)-binding protein) C terminus ; UBA : *Ubiquitine-associated domain* ; ZnF : *zinc finger*.

Les membres de la famille Nedd4 contiennent un domaine C2 en partie N-terminale, 2 à 4 domaines WW et un domaine C-terminal HECT. Le domaine C2 lie les phospholipides et permet l'adressage des E3 à la membrane plasmique, aux endosomes et aux MVB. (*Plant PJ et al., J Cell Biol, 2000* ; *Dunn R et al., J Cell Biol, 2004*), alors que le domaine WW lie des motifs PY présents dans la protéine cible (*Staub O et al., EMBO J, 1996* ; *Kanelis V et al., Nat Struct Biol, 2001*). La famille Nedd4 est constituée de 9 membres chez l'homme : Nedd4, Nedd4-2 (Nedd4L), ITCH, Smurf1, Smurf2, Wwp1, Wwp2, NedL1 et NedL2 (*Harvey KF et al., Trends Cell Biol, 1999* ; *Ingham RJ et al., Oncogen, 2004* ; *Shearwin-Whyatt L. et al., Bioessays, 2006*).
Nedd4 et Nedd4-L sont plus proches génétiquement que les autres membres de la famille. Des analyses phylogénétiques de ces protéines indiquent que Nedd4 serait le membre le plus ancien de la famille. Nedd4 et Nedd4-L ont des spécificités communes pour les mêmes E2 (*Fotia AB et al., Int J Biochem Cell Biol, 2006*). Les membres de la famille Nedd4 possèdent une structure commune et la seule variation observée se trouve

dans le nombre et la position des domaines WW dans la protéine (*Ingham RJ et al., Oncogene, 2004* ; *Shearwin-Whyatt L et al., Bioessays, 2006* ; *Harvey KF et al., J Biol Chem, 1999*). Les domaines WW sont les principaux déterminants de reconnaissance des substrats chez la famille Nedd4, même si d'autres régions comme le domaine C2 peuvent également interagir avec les substrats (*Plant PJ et al., J Cell Biol, 2000*). A l'aide de ces multiples domaines WW chez les membres Nedd4 et Nedd4-L, ces E3 peuvent potentiellement interagir avec plusieurs substrats ou autres protéines régulatrices. Ces domaines WW reconnaissent des motifs PPxY (PY) ou LPSY. Par ailleurs, la plupart de membres de la famille Nedd4, particulièrement Nedd4-L ont aussi de nombreux variants issus d'épissages alternatifs et doivent jouer des rôles différents au niveau de leurs substrats (*Itani OA et al., Am J Physiol Renal Physiol, 2003* ; *Itani OA et al., Am J Physiol Renal Physiol, 2005*). La première cible décrite de Nedd4 a été le canal sodique épithélial (*Epithelial sodium channel* ou ENaC). Cependant, après la découverte de Nedd4-L, il a été suggéré que Nedd4 et Nedd4-L aient probablement des fonctions redondantes dans la régulation du ENaC (*Harvey KF et al., J Biol Chem, 2001* ; *Kamynina E et al., FASEB J, 2001* ; *Snyder PM et al., J Biol Chem, 2004*). Plus tard, de nombreux autres substrats ont été identifiés, spécifiques à Nedd4 et Nedd4-L (**Figure 27**).

Nedd4	
β2-AR	β2-adrenergic receptor
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
connexin43	Gap junction protein
EGFR	Endothelial growth factor receptor
ENaC	Epithelial sodium channel
γ2-Adaptin	Ubiquitin-interacting adaptor
MTMR4	Inositol phosphatase
Na_v	Voltage-gated sodium channels
Notch1	Notch homolog 1
pol II	RNA polymerase II
Smad4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
Spy1A	Cyclin-dependent kinase activator
VEGF-R2	Vascular endothelial growth factor receptor-2
Nedd4-2	
14-3-3	Adaptor/regulatory protein
ACK1	Activated Cdc42-associated kinase 1
ATA2	Amino acid transporter
ClC-5	Chloride ion channels
CLC-Ka/barttin	Chloride ion channels
DT	Dopamine transporter
EAAT1/2	Glutamate transporter
ENaC	Epithelial sodium channel
KCNQ 1,	Voltage-gated $K^{(+)}$channels

Figure 27: Potentiels substrats ou partenaires de Nedd4 et Nedd4-L.

L'implication de la famille Nedd4 dans la régulation de la réponse immune a été soulignée dans la fonction de l'E3 ITCH (*Perry W et al., Nature Genet, 1998*). Le mutant *Itchy* chez la souris, qui n'exprime plus ITCH, montre un défaut dans la différenciation des lymphocytes T *helper* (T_H2), et une augmentation de la production d'IL-4, IL-5, d'immunoglobulines (Ig) G et IgE qui sont des marqueurs de l'auto-immunité (*Fang D et al. Nat Immunol, 2002*). JUNB, un régulation de la transcription du gène *IL-4*, est un substrat de l'E3 ITCH (*Gao M et al., Science, 2004*), ce qui explique l'augmentation de la quantité de IL-4 chez les mutants du gène *Itchy*

chez les souris. De façon intéressante, l'activation des cellules T conduit à la phosphorylation et à l'activation de ITCH *via* JNK-1, permettant l'ubiquitinylation dépendante de JUNB et JUN par ITCH (*Gao M et al., Science, 2004*). JNK-1 est nécessaire à la régulation négative de l'activation des T_H2 (*Heissmeyer V et al., Nat Immunol, 2004*).

Toujours au sein de la famille Nedd4, Wwp1 (*WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1)* est une protéine multifonctionnelle constituée d'un domaine C2 en N-terminal, 4 domaines en tandem WW pour la liaison au substrat et un domaine catalytique HECT en C-terminal pour le transfert de l'Ub. Wwp1 a une activité E3-ligase *via* des domaines PY présents sur les protéines cibles, telles que Smad2, KLF5 ou encore Gag du VIH-1, mais également en l'absence de ce motif PY sur des protéines telles que TβR1, Smad4 ou KLF2. Wwp1 régule une grande variété de processus biologiques cellulaires comme le trafic et la dégradation, la transcription ou encore le bourgeonnement viral. Elle a été impliquée dans plusieurs maladies comme le cancer, des maladies infectieuses et neurologiques, et dans le vieillissement.

Une dernière E3 qu'il est intéressant de détaillé est l'HECT-E3 UBAP1 (*ubiquitin-associated protein 1*) car cette E3 interagit avec des composants des complexes ESCRT. Ces complexes ESCRT régulent plusieurs évènements impliquant des invaginations membranaires, incluant la biogénèse des MVB, du bourgeonnement viral et la cytokinèse (*Peel S et al., Trends Biochem Sci, 2011*). Dans chaque cas, les protéines appartenant aux complexes ESCRT-0, -I et -II, combinés à d'autres facteurs cellulaires tels que les protéines Bro1 (*Odorizzi G et al., J Cell Sci, 2003* ; Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP. ; *Doyotte A et al., PNAS, 2008*), recrutent ESCRT-III et l'ATPase VPS34 dans le but d'engager l'abscission membranaire (*Wollert T et al., Nature, 2010*). UBAP1 a été identifié comme un nouveau composant d'ESCRT-I (composé de Tsg101, VPS28, VPS37A-D et MVB12A/B). Il s'avère qu'UBAP1 possède également une région conservée présente dans MVB12 (*de Souza RF & Aravind L, Bioinformatics, 2010*). UBAP1 interagit avec la protéine endosomale Bro1 mais pas avec Alix impliqué dans la cytokinèse (*Morita E et al., EMBO J, 2007* ; *Carlton JG & Martin-Serrano J, Science, 2007*). UBAP1 est requis pour l'adressage de l'EGFR aux MVB et pour l'homéostasie de l'ubiquitine, mais pas pour la cytokinèse. Cette HECT-E3 fait partie d'un complexe où sont également retrouvées les protéines Tsg101 et VPS37A. Par ailleurs, le complexe ESCRT-I-UBAP1 semblerait important à la dégradation de protéines antivirales présentes à la surface cellulaire comme BST2 *via* les protéines virales Vpu du VIH-1 et kK5 du KSHV (*Agromayor M et al., Structure, 2012*).

ii) Les enzymes E3 à domaines RING

Les RING-E3 cytosoliques

Le génome des mammifères encode potentiellement pour plus de 600 RING-E3 (*Li W et al., PLoS ONE, 2008*). Un domaine RING est un domaine coordonné par deux atomes de Zn^{2+} et est formé d'une série de résidus cystéines et histidines, facilitant l'ubiquitinylation par l'E2 (*Lorick KL et al., PNAS, 1999*). La structure du domaine RING de Cbl en complexe avec l'E2 a permis de déterminer des caractéristiques importantes aux domaines RING (*Zheng N et al., Cell, 2000*). Les deux ions de Zn^{2+} et les résidus associés forment une structure en croix (**Figure 25B**). Au contraire des domaines HECT, les domaines RING ne forment pas d'intermédiaires catalytiques avec l'Ub. En fait, ce domaine RING sert d'échafaudage et permet le rapprochement de l'E2 et du substrat, et une étude suggère que le domaine RING peut activer l'E2 de façon allostérique (*Ozkan E et al., PNAS, 2005*).

Les membres de la famille RING-E3 peuvent agir en tant que monomères, dimères ou de complexes multiprotéiques. La dimérisation s'établit généralement *via* le domaine RING ou des régions alentours et peut être de nature homodimérique (telles que les RING-E3 RNF4, SIAH, TRAF2…) ou hétérodimérique (telles que les RING-E3 MDM2, BRCA1…). Des domaines RING peuvent s'associer à de nombreuses sous-unités, comme c'est le cas par exemple de la superfamille des Cullin RING ligase (CRL-E3) (*Hua Z & Vierstra RD, Annu Rev Plant Biol, 2011* ; *Petroski MD & Dehaies RJ, Nat Rev Mol Cell Biol 2005*) qui inclue le complexe SCF formé de la *S-phase kinase-associated protein 1* (SKP1), de la Cullin et de la protéine F-box.

Par exemple, un complexe multiprotéique d'une RING-E3 appartenant aux CRL-E3 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Les SCF-E3 utilisent des F-box variables permettant la reconnaissance de plusieurs substrats. Ainsi, il y aurait environ 69 SCF-E3 différentes chez les mammifères. Les deux protéines F-box impliquées dans le cycle cellulaire sont SKP2 et la *béta-transducin repeat-containing protein* (β-TrCp) (*Frescas D & Pagano M, Nat Rev Cancer, 2008*). SCF^{SKP2} est actif pendant les phases S et G2 et est responsable de la dégradation de p21 et p27 *via* le système UPS, entrainant l'activation de CDK1 et CDK2. $SCF^{\beta\text{-TrCp}}$ adresse CDC25 et WEE1 (une autre phosphatase) vers les voies de dégradation pendant la phase G2, exerçant respectivement à la fois un effet positif et négatif sur l'activité de CDK1. $SCF^{\beta\text{-TrCp}}$ est également responsable de la dégradation d'EMI1 (un régulateur mitotique interagissant avec CDC20 et inhibant le complexe d'anaphase) en fin de phase G2 (*Frescas D & Pagano M, Nat Rev Cancer, 2008*).

Le premier membre de la famille RING-E3 a été isolé à partir d'un rétrovirus induisant des lymphomes (*casitas B-lineage lymphoma*). Cette forme, appelée v-Cbl, est en fait une forme tronquée de la protéine sauvage c-Cbl (*Langdon WY, PNAS, 1989*). Plus tard seront identifiés chez les mammifères trois autres isoformes de l'E3 : c-Cbl, b-Cbl et Cbl-c. Comme toutes les RING-E3, ces protéines Cbl possèdent de nombreux domaines d'interactions. Cependant, elles présentent deux régions très conservées : un domaine d'interaction avec les tyrosines kinases (le domaine TκB) et le domaine RING (**Figure 28)**.

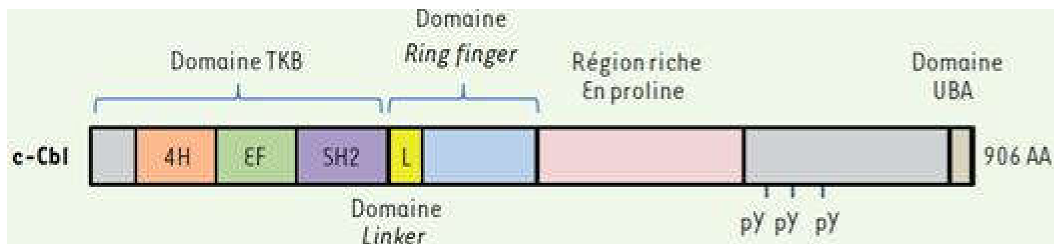


Figure 28: représentation schématique de la protéine c-Cbl. Le domaine TκB permet l'interaction avec les tyrosines phosphorylées des autres protéines. Le domaine RING contrôle l'activité ligase de c-Cbl. Le domaine UBA permet l'interaction avec l'Ub.

Le domaine TκB, permettant donc les interactions avec les tyrosines phosphorylées des substrats, est composé de 4 hélices-α, d'un domaine d'interaction avec le Ca^{2+}, et d'un domaine SH2 (*src homology 2 domain*). Ce domaine SH2 va définir la spécificité du substrat à ubiquitinyler. Le domaine *linker* permet de faire le lien entre le domaine TκB et le domaine RING. En son sein sont présents deux résidus tyrosines essentiels (Y^{368} et Y^{371}) dont la mutation entre la perte de fonction de l'E3 et lui confère un pouvoir oncogénique. Ces deux tyrosines servent de substrats de phosphorylation pour les récepteurs tyrosines kinase (*Dikic I et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2009*). Du fait de ses multiples domaines d'interaction, c-Cbl interagit avec et contrôle la dégradation d'un grand nombre de protéines cibles telles que certains récepteurs à activité tyrosine kinase (l'*epidermal growth factor receptor* ou EGFR, l'*insulin-like growth factor receptor* ou IGF1R…), des récepteurs à cytokines (IL-3, IL-4, CSF-1…), des protéines cytosoliques à activité tyrosine kinase (Src kinases) et des protéines cytoplasmiques (PI3K…) (*Thien CB & Langdon WY, Nat Rev Mol Cell Biol, 2001* ; *Tsygankov AY et al., Oncogene, 2001*).

Les RING-E3 transmembranaires

Certaines RING-E3 ont la particularité de ne pas se trouver à l'état libre dans la cellule, mais sont ancrées aux membranes par un ou plusieurs domaines transmembranaires. Cette famille de RING-E3 est divisée en trois sous-classes. Il y a les RING-HC (C3HC4), les RING-H2 (C3H2C3) et les RING-CH (C4HC3) qui se distinguent les unes des autres par l'ordre des résidus Cys et His qui lient les ions dans leurs domaines RING. Les ligases RING-CH, sur lesquelles nous focaliserons notre attention, possèdent de multiples parties transmembranaires et sont appelées MARCH (*membrane-associated RING-CH*). Toutes les MARCH partagent en commun une organisation de protéine transmembranaire de type III. Les 2 régions transmembranaires sont localisées dans la partie centrale des protéines et le domaine RING-CH en partie N-terminale. La partie C-terminale est de longueur et de nature variable caractérisant chacune des MARCH. Les parties N-terminale et C-terminale sont cytosoliques et un très court segment (d'environ 12 acides aminés) est dans la lumière extracellulaire. L'exposition du domaine RING-CH dans le cytosol permet à l'E3 d'interagir avec les composants de la machinerie d'ubiquitinylation (**Figure 29**)

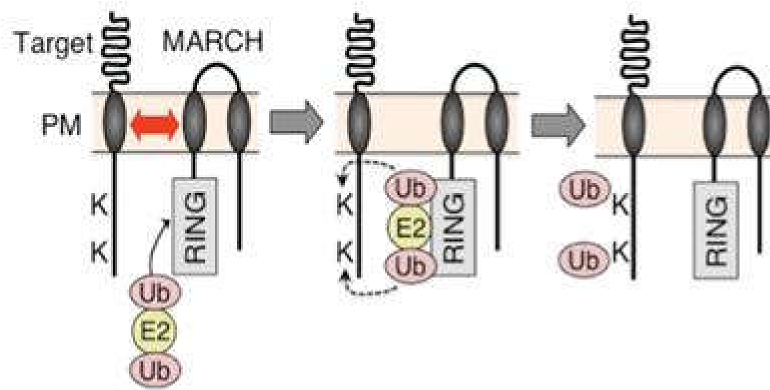


Figure29 : Ubiquitinylation de protéines membranaires par les MARCH-E3. Les MARCH reconnaissent le substrat *via* leurs parties transmembranaires (gauche) ; le domaine RING-CH de l'E3 ligase, qui transfère l'ubiquitine (Ub) aux sites récepteurs dans la queue cytoplasmique de la protéine cible (centre), entrainant l'ubiquitinylation du substrat (droite).

La surexpression de cette famille de RING-E3 entraine la diminution d'expression de surface de nombreuses protéines *via* leur ubiquitinylation. Les premiers exemples décrits de MARCH ont été trouvés chez les espèces virales du KSHV (*kaposi's sarcoma associated herpesvirus*) et les MHV-68 (*murine gamma-herpesvirus 68*), et ont été désignés comme des modulateurs de la reconnaissance immunitaire (MIR pour *modulator of immune recognition*) 1, 2 et mK3, respectivement. MIR1, MIR2 et mK3 sont capables de diminuer l'expression des molécules du CMH-I, et mK3 est nécessaire à l'établissement de la latence virale. Le premier homologue de MIR1, MIR2 et mK3 identifié chez les mammifères est c-MIR/MARCH8. La surexpression de c-MIR/MARCH8 diminue l'expression du HLA-B7.2 (*Goto E et al. J Biol Chem, 2003*), une molécule nécessaire à la présentation antigénique. Par la suite, plusieurs protéines proches de c-MIR/MARCH8 ont été caractérisées chez les mammifères. Onze homologues ont été identifiés (*Holzerlandt R et al., Genome Res, 2002 ; Jenner RG & Boshoff C, Biochem Biophy Acta, 2002 ; Morokuma Y et al., J Biol Chem, 2007*). Toutes ces nouvelles protéines identifiées, à l'exception de MARCH7 et MARCH10, possèdent un domaine RING-CH à leurs extrémités N-terminal et sont suivis par deux ou plusieurs domaines transmembranaires (*Ohmura-Hoshino M et al., J Biochem, 2006 ; Bartee E et al., J Virol, 2004 ; Lehner PJ et al., Immunol Rev, 2005*). MARCH7 et MARCH10 ne semblent pas posséder de domaines transmembranaires et leurs domaines RING-CH sont localisés en C-terminal.

Les protéines MARCH les plus caractérisées chez l'homme et la souris sont les MARCH1 et MARCH8 (c-MIR). Ces RING-E3 possèdent de grandes homologies de séquences et des similarités fonctionnelles. En plus de la modulation d'expression du HLA-B7.2 par MARCH8, MARCH1 et MARCH8 diminuent également l'expression de CD95 (Fas), du TfR (*transferrin receptor*) et du CMH-II (*Bartee E et al., J Virol, 2004 ; Ohmura-Hoshino M et al., J Immunol, 2006 ; de Gassart A et al., PNAS, 2008 ; Matsuki Y et al., Embo J, 2007 ; Thibodeau J et al., Eur J Immunol, 2008*). Ces observations suggèrent un rôle possible de MARCH1 et MARCH8 dans la régulation et/ou activation des lymphocytes. La reconnaissance des substrats par

MARCH1 et MARCH8 se fait à la membrane plasmique avec une interaction directe entre les parties transmembranaires des protéines (*Goto E et al. J Biol Chem, 2003*).

Un autre couple intéressant de MARCH est le couple MARCH4 et MARCH9. Ces deux MARCH induisent une diminution de l'expression de surface et une rapide internalisation du CMH-I de façon ubiquitine-dépendant (*Bartee E et al., J Virol, 2004).* Ces résultats suggèrent que dans un environnement cellulaire normal, MARCH4 et MARCH9 régulent la présentation antigénique du CMH-I de façon similaire à leurs homologues viraux kK3 et kK5 du KSHV. De façon intéressante, la régulation du CMH-I par MARCH4 et MARCH9 est dépendant des Lys de la partie C-ter du CMH-I (*Bartee E et al., J Virol, 2004)* alors que kK3 et kK5 peuvent aussi ubiquitinyler sur des résidus Cys. Cependant, certaines différences de régulations sont observées et suggèrent que MARCH4 et MARCH9 ont quand même des rôles physiologiques différents. Les parties RING-CH de MARCH4 et MARCH9 interagissent avec différentes enzymes E2, même si ces domaines sont très homologues (*Bartee E et al., J Virol, 2004)*. Les différentes E2 ne sont pas encore connues, mais pourraient être importante pour permettre de définir les différences fonctionnelles entre MARCH4 et MARCH9. Cette conclusion est basée sur le fait que les interactions E2-E3 sont connues pour jouer un rôle pivot dans la détermination de la longueur et le type de liaison de la chaine d'Ub.

MARCH2 et MARCH3 ont été reportées comme exprimées de manière ubiquitaire et sont localisées dans les vésicules endosomales (*Fukuda H et al., J Biochem, 2006 ; Nakamura N et al., Mol Cell Biol, 2005*). De plus, deux de leurs homologues interagissent avec la syntaxin-6 (*Nakamura N et al., Mol Cell Biol, 2005*) qui est une SNARE exprimée de manière ubiquitaire qui se localise dans le TGN et les endosomes, et est impliquée dans de nombreux processus de trafic protéique (*Bock JB, Mol Biol Cell, 1997*). Par ailleurs, la surexpression ou délétion/mutation de MARCH2 et MARCH3 affectent la localisation de la syntaxin-6 et de TGN38/46. MARCH2 et MARCH3 sont probablement des régulateurs de la voie TGN-endosomes.

B – Implication de l'ubiquitinylation dans la réplication du VIH-1

Afin que les virus se répliquent de manière efficace, ils doivent constamment combattre et affaiblir les défenses immunes de l'hôte pour éviter leur élimination. Ces interactions exposent les protéines virales à de nombreuses voies de signalisation cellulaires qui pourraient modifier post-traductionnelement leurs rôles et leurs fonctions, mais en même temps, les virus peuvent exploiter ces machineries cellulaires en la faveur de leur infection ; dans ce contexte, les protéines d'Ub et Ubl jouent un rôle majeur dans le contrôle de ces interactions protéiques, dans leur localisation et leur stabilité, et sont des régulateurs clés de la réponse immune et la prolifération cellulaire. En effet, il a été montré que les Ub et Ubl jouent un rôle majeur dans la réplication du VIH-1.

1) Ubiquitinylation et régulation du trafic de CD4

Nef, protéine myristoylée et associée aux membranes, peut altérer le trafic de protéines dans les cellules T CD4+ et par conséquent augmenter la réplication virale en inhibant l'E3 ubiquitine ligase c-Cbl (*Simmons A et al, Immunity, 2005*). De façon plus spécifique, Nef entraine la déplétion de l'enzyme de conjugaison de l'Ub E2 UbcH7 de la membrane, et ce processus nécessite son ubiquitinylation par l'E3-ligase c-Cbl. Cette réaction va conduire à une régulation négative des protéines Vav et Lck, nécessaires au trafic de CD4. Les mécanismes par lesquels Nef exclue UbcH7 des radeaux lipidiques restent inconnus.

Nef, Vpu et dans une certaine mesure Env, peuvent également diminuer l'expression de CD4. Nef entraine l'endocytose et la dégradation lysosomale de molécules de CD4 déjà présents à la surface cellulaire *via* une interaction avec la machinerie d'endocytose dépendant d'AP2 et de la clathrine, adressant alors CD4 vers les MVB et éventuellement vers leur dégradation par la voie lysosomale (*daSilva LL et al., J Virol, 2009 ; Laguette N et al., Mol Aspects Med, 2010*). La di-ubiquitinylation de Nef sur le résidu Lys144 peut servir de signal d'endocytose au complexe CD4-Nef-AP2, et est nécessaire à la diminution de CD4 par Nef (*Jin YJ et al., J Immunol, 2008*).

Env et Vpu diminuent également l'expression de CD4 à la surface cellulaire en inhibant son transport du RE à la membrane plasmique. Le précurseur gp160 forme un complexe stable avec CD4 qui le retient dans le RE. Vpu interagit aussi avec CD4 dans le RE. Plus précisément, Vpu lie simultanément CD4 et β-TrCp, un composant du complexe E3 ligase $SCF^{\beta\text{-}TrCp}$, entrainant la polyubiquitinylation de CD4 et sa dégradation par le protéasome. De façon surprenante, l'ubiquitinylation et la dégradation de CD4 nécessite le système de dégradation ERAD du RE bien que β-TrCp soit une protéine cytosolique (*Binette J et al., Retrovirology, 2007 ; Magadan JG et al., PLoS Pathog, 2010*).

2) Ubiquitinylation et restriction du VIH-1 par TRIM5α

TRIM5α contient un domaine RING d'ubiquitine E3-ligase et a un rôle de facteur de restriction lors de l'entrée du VIH-1 dans la cellule en entrainant une décapsidation précoce du *core* viral, et empêchant ainsi la transcription inverse (*Stremlau M et al.,PNAS, 2006 ; Perron MJ et al.,J Virol, 2007*). Cependant, la fonction d'E3 ligase de TRIM5α reste controversée car des expériences ont montré que la déplétion du domaine RING de TRIM5α a seulement un effet partiel sur la restriction virale (*Javanbakht H et al., J Biol Chem, 2005 ; Nakayama EE & Shioda T, Rev Med Virol, 2010*). Au contraire, des résultats récents montrent que l'activation de l'activité E3 ubiquitine ligase de TRIM5α par la protéine de MA favorise la formation de chaines libres d'Ub de type K63, permettant l'activation d'AP1 et de NFκB (*Pertel T et al., Nature, 2011)*. De façon intéressante, d'autres résultats montrent que les protéines de la famille TRIM peuvent également jouer un rôle de SUMO-ligase (*Chu Y & Yang X, Oncogene, 2011*).

3) Ubiquitinylation et rôle de Vpr dans l'activité d'UNG2

La transcription inverse du VIH-1 est un processus qui génère une mutation tous les 2000-5000 nucléotides transcrits. Ces mutations sont principalement dues à l'incorporation accidentelle de dUTP ou à la déamination de cytosines qui forme de l'uracile. Si l'uracile n'est pas correctement enlevé de l'ADN viral par l'uracile-N-glycosylase (UNG) ou dUTPase, cela conduit à des mutations C-T sur un brin d'ADN et G-A sur l'autre brin. UNG2, la forme nucléaire d'UNG, est incorporée dans les virions et permet la correction des erreurs de la transcription inverse du VIH-1 et permet d'augmenter la fidélité de sa réplication (*Schrofelbauer B et al., J Virol, 2005*).

Vpr interagit avec la forme nucléaire d'UNG2, mais les conséquences de cette interaction ne sont pas complètement claires. Vpr semble augmenter la fidélité de la RT en recrutant UNG2 dans la particule virale, permettant l'extraction de l'uracile de l'ADN. Cependant, Vpr contrecarre également l'activité d'UNG2 en favorisant sa dégradation par le protéasome. Pour cela, Vpr recrute le complexe E3 ubiquitine ligase DCAF1-DDB1-Cul4 *via* sa liaison directe avec DCAF1, entrainant l'ubiquitinylation d'UNG2 (*Schrofelbauer B et al., J Virol, 2005 ; Schrofelbauer B et al., PNAS, 2007 ; Ahn J et al., J Biol Chem, 2010*). L'interaction Vpr-DCAF1 induit également l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Dans ce cas, Vpr recrute une facteur cellulaire encore inconnu nécessaire au passage G2-M (*DeHart JL et al., J Virol, 2007*).

4) Ubiquitinylation et dégradation d'APOBEC3G par Vif

Vif est responsable de l'ubiquitinylation et de la dégradation d'APOBEC3G *via* le recrutement d'une ubiquitine ligase médiée par Cul5 (*Yu X et al., Science, 2003*). En fait, Vif possède un domaine SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) (*Mehle A et al., Genes Dev, 2004*), motif caractéristique pour les protéines adaptatrices des E3 ubiquitine ligases permettant la liaison avec le complexe d'ubiquitinylation Cul5-Elongin B-Elongin C-Rbx1 (*Merlet J et al, Cell Mol Life Sci, 2009*). Cependant, l'interaction de Vif avec ce complexe est réalisée grâce à d'autres domaines permettant une interaction directe entre Vif et Cul5 (*Barraud P et al., Curr HIV Res, 2008*). Vif peut également favoriser l'ubiquitinylation d'autres membres de la famille APOBEC tels que APOBEC3F et APOBEC3C (*Shirakawa K et al., Virology, 2006*). Cependant, Vif est également ubiquitinylé dans ce processus (*Mehle A et al., Genes Dev, 2004*) et son ubiquitinylation pourrait être suffisante pour adresser APOBEC3G à la dégradation (*Dang Y et al., J Biol Chem, 2008*).

Vif joue également un rôle dans la dégradation d'autres protéines telles que IRF-3 (*interferon regulatory factor -3*), régulateur important de la réponse antivirale (*Okumura A et al., Virology, 2008*) et p53 (*Izumi T et al, PNAS, 2010*). Ces dégradations requièrent l'E3 ubiquitine ligase Cul5 (*DeHart JL et al., J Virol, 2008*). Enfin, de façon indépendante de l'auto-ubiquitinylation de Vif dans le complexe Cul5, Vif est également ubiquitinylée par d'autres E3 ligases. Par exemple, les E3-ligases HECT Nedd4 et AIF4 peuvent augmenter la monoubiquitinylation de Vif (*Dussart S et al., Biochem Biophys Res Commun, 2004*) et la RING-E3 ubiquitine ligase Mdm2 permet de contrôler la stabilité de Vif à travers sa polyubiquitinylation (*Izumi T et al., Retrovirology, 2009*).

5) Ubiquitinylation et entrée du génome viral dans le noyau

RanPB2, une E3 SUMO ligase présente dans le complexe du pore nucléaire (*nuclear pore complexe* ou NPC) est requis dans les événements précoces de la réplication du VIH-1 (*Brass AL et al., Science, 2008* ; *Konig R et al., Cell, 2008*) et est importante dans l'intégration du génome viral (*Ocwieja KE et al., PLoS Pathog, 2011*). En effet, l'IN est SUMOylée et cette modification est essentielle pour la réplication du VIH-1. Cette réplication est affectée lorsque les sites de SUMOylations, phylogénétiquement très conservés, sont mutés. Cependant, cette SUMOylation n'influence pas l'activité enzymatique de l'IN et il a été supposé que la SUMOylation de l'IN joue un rôle dans l'affinité de cofacteurs interagissant avec l'IN (*Zamborlini A et al., J Biol Chem, 2011*). L'IN est une protéine relativement instable et est rapidement dégradée par le protéasome lorsqu'elle est surexprimée seule dans des cellules mammifères, et ce processus est médiée par un complexe d'ubiquitinylation. Parmi toutes les protéines qui interagissent avec l'IN, on retrouve deux E3 ubiquitine ligase (Rad18 et Huwe1 également appelée Mule, ARFBP1, HECTH9, $E3^{HISTONE}$, LASU1 ou UREB1), mais elles ne semblent pas adresser l'IN vers la dégradation ni jouer un rôle dans son ubiquitinylation (*Mulder LC et al., J Biol Chem, 2002* ; *Yamamoto SP et al., Microbes Infect, 2011*). Mais il a été montré que l'interaction entre Huwe1 et l'IN joue un rôle négatif sur l'infectivité des particules virales (*Yamamoto SP et al., Microbes Infect, 2011*).

6) Ubiquitinylation et transcription du génome viral

De façon importante, les fonctions de Tat sont intimement liées au système d'ubiquitinylation protéasomale (*ubiquitin-proteasom system* ou UPS). Tat peut interagir avec le protéasome 26S et inhiber son activité protéolytique (*Seeger M et al., J Biol Chem, 1997* ; *Apcher GS et al., FEBS letter, 2003*). Cette protéine virale peut également altérer la composition du protéasome et son activité (*Remoli AL et al., Biochem J, 2006*). Ces effets directs sur les propriétés protéolytiques du protéasome permettent une meilleure réplication virale. De façon intéressante, comme le protéasome et ses composants jouent un rôle dans la transcription (*Collins GA & Tansey WP, Curr opin Genet Dev, 2006*), Tat permet une augmentation de la transcription des gènes du VIH-1 (*Lassot I et al., Mol Cell, 2007*) en interférant avec l'assemblage du protéasome *via* le recrutement de la protéine chaperonne Rpn14 (*Bedford L et al., Trends Cell Biol, 2010*). De plus, l'ubiquitinylation de Tat médiée par l'E3 ubiquitine ligase Mdm2 stimule son activité transcriptionnelle (*Brès V et al., Nat Cell Biol, 2003*). Cette modification de Tat permettrait de recruter ou de stabiliser des facteurs encore inconnus au niveau des promoteurs de gènes importants pour la transcription du VIH-1. Un autre événement important dans l'activité de Tat est l'ubiquitinylation de Cdk9 par le complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{Skp2} après le recrutement de cette E3 ligase sur la protéine P-TEFb *via* son interaction avec le domaine PEST de la Cyc T1 (*Kiernan RE et al., Mol Cell Biol, 2001*). Cette réaction facilite la formation d'un complexe ternaire entre P-TEFb, Tat et TAR, augmentant l'élongation transcriptionnelle du génome du VIH-1 (*Barboric M et al., J Virol, 2005*).

7) Ubiquitinylation et bourgeonnement viral

La liaison de Tsg101 au motif PTAP de la protéine p6 se fait à travers son domaine UEV. Les analyses structurales ont montré que ce domaine UEV de Tsg101 peut lier simultanément l'Ub et le motif PTAP (*Sundquist WI et al., Mol Cell, 2004*) suggérant que Tsg101 peut interagir avec des formes ubiquitinylées de Gag. En effet, plusieurs observations ont montrées que durant l'infection par le VIH-1, Gag est monoubiquitinylé sur certaines lysines de p6 (*Ott DE et al., Virology, 2000*) mais également dans d'autres régions. Cette ubiquitinylation de Gag est liée à l'encrage même de Gag à la membrane (*Jager S et al., J Virol, 2007*).

La liaison d'ALIX au motif LYPxL de Gag permet le recrutement des HECT-E3 ubiquitine ligase Nedd4 au niveau du site de bourgeonnent viral. Ce processus conduisant à l'ubiquitinylation d'Alix sert probablement de mécanisme de secours du bourgeonnement viral, étant donné que cette ubiquitinylation devient plus importante au moment suivant la disruption du motif PTAP et des complexes ESCRT-I (*Sette P et al., J Virol, 2010*) Néanmoins, cela souligne l'importance de l'ubiquitinylation dans la libération des particules virales du VIH-1. Ce mécanisme de secours peut être stimulé par l'ubiquitinylation d'Alix lors de la surexpression de l'E3 ubiquitine ligase POSH (*Votteler J et al., BMC Biochem, 2009*). De façon intéressante, il existe certains isoformes de Nedd4 qui partagent une structure commune caractérisée par un domaine C2 N-terminal impliqué dans la liaison aux membranes, des domaines WW servant aux interactions avec de nombreux substrats et un domaine HECT C-terminal possédant une activité E3 ubiquitine ligase. Nedd4-Ls est la forme native et l'isoforme le plus commun chez l'homme de Nedd4-L, auquel il manque la majeure partie du domaine C2 du à l'épissage alternatif. Cependant, le domaine C2 résiduel capable de s'associer avec Gag (*Usami Y et al., J Virol, 2008*) est essentiel pour l'augmentation de la libération des particules virales par Nedd4-Ls. Nedd4-Ls permet l'augmentation de l'ubiquitinylation de Gag (chaines de type K63) (*Weiss ER et al., PLoS Pathog, 2010*).

C – Rôle de l'ubiquitinylation de BST-2, et dans la modulation de son expression par Vpu

Des expériences récentes ont montré que β-TrCp est requise dans la dégradation de BST-2 induite par Vpu. La déplétion de β-TrCp par ARNi ou l'inactivation du complexe ubiquitine ligase $SCF^{\beta\text{-TrCp}}$ par surexpression d'un dominant négatif (DN) de β-TrCp, β-TrCpΔF, qui interagit avec Vpu mais n'est pas capable de lier le complexe $SCF^{\beta\text{-TrCp}}$, abroge la capacité de Vpu à dégrader BST-2, indiquant que le recrutement du $SCF^{\beta\text{-TrCp}}$ est critique à la dégradation de BST-2 par Vpu (*Mitchell RS et al., PLoS Pathog, 2009 ; Douglas JL et al., J Virol, 2009 ; IwabuY et al., J Biol Chem, 2009)*. De plus, Vpu tire avantage de l'isoforme β-TrCp2 cytoplasmique, mais pas de l'isoforme nucléaire β-TrCp1, pour dégrader BST-2 (*Mitchell RS et al., PLoS*

Pathog, 2009 ; IwabuY et al., J Biol Chem, 2009). Par ailleurs, β-TrCp forme un complexe ternaire avec Vpu et BST-2, mais est dispensable à l'interaction entre BST-2 et Vpu (*Douglas JL et al., J Virol, 2009)*.

Au départ, le processus de dégradation semblait être de nature protéasomale puisque de longs traitements avec des inhibiteurs du protéasome prévenaient la dégradation de BST-2 par Vpu (*Mangeat B et al., PLoS Pathog, 2009 ; Gupta RK et al., PLoS Pathog, 2009 ; Goffinet C et al., J Virol, 2010*). Par ailleurs, la surexpression d'Ub K48R, un mutant DN de l'Ub interférant avec la polyubiquitinylation, empêche la dégradation de BST-2 (*Mangeat B et al., PLoS Pathog, 2009)*. Consistant avec ces résultats, Vpu augmente l'ubiquitinylation de BST-2 en présence de β-TrCp sur les résidus S, T, C et K présent dans sa partie cytosolique (*Tokarev AA et al., J Virol, 2010*). De façon intéressante, la déplétion de la AAA ATPase p97 du complexe ERAD affecte la dégradation de BST-2 induite par Vpu (*Mangeat B et al., PLoS Pathog, 2009)* suggérant que la voie de dégradation *via* le système ERAD du RE est impliquée. Cependant, ces résultats sont souvent obtenus lors d'utilisation de BST-2 taggé surexprimé qui peut entrainer l'accumulation de protéines immatures dans le ER (*Andrew AJ et al., Retrovirology, 2009*). De plus, de long traitements par des inhibiteurs du protéasomes ou la surexpression d'Ub K48R entrainent la déplétion du pool d'Ub libre dans la cellule, affectant indirectement la dégradation de protéines *via* la voie lysosomale dans laquelle l'ubiquitine est requise (*Douglas JL et al., PLoS Pathog, 2010 ; Melikova MS et al., Cell Biol Int, 2006*). Les inhibiteurs de l'acidification des lysosomes tels que la Bafilomycine A et la Concanamycine inhibent également la dégradation de BST-2 induite par Vpu et peuvent interférer avec la diminution de BST-2 à la surface cellulaire (*Mitchell RS et al., PLoS Pathog, 2009 ; Douglas JL et al., J Virol, 2009).* Ces observations sont en accord avec de récentes observations où BST-2 subit des monoubiquitinylation sur les résidus lysines 18 et/ou 21 présentes dans sa partie cytosolique en présence de Vpu (*Pardieu C et al., PLoS Pathog, 2010*). Ensemble, ces résultats supportent le modèle suivant lequel BST-2 subit une dégradation *via* la voie de dégradation lysosomale en présence de Vpu. Cependant, la voie de dégradation protéasomale ne peut être complètement exclue.

Bien que l'expression de Vpu entraine la dégradation de BST-2 dans presque tous les systèmes cellulaires, certains résultats suggèrent que la dégradation de BST-2 en tant que telle ne peut pas être totalement induite par Vpu. Par exemple, il a été observé que l'expression de Vpu diminue beaucoup moins l'expression totale de BST-2 intracellulaire qu'à la surface cellulaire dans les HeLa (*Mitchell RS et al., PLoS Pathog, 2009)*. De plus, des mutants de Vpu contenant des mutations dans le motif de reconnaissance de β-TrCp $DS^{P}G\Phi XS^{P}$ abolissant la dégradation de BST-2 sont encore capables de favoriser la libération des particules virales de manière partielle *(Schubert U et al., J Virol, 1995 ; Van Damme N et al., Cell Host Microbe, 2008 ; Mitchell RS et al., PLoS Pathog, 2009 ; Douglas JL et al., J VIrol, 2009 ; Mangeat B et al., PLoS Pathog, 2009)* ou totale (*Friborg J et al., J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995 ; Miyagi E et al., PNAS, 2009 ; Schindler M et al., Retrovirology, 2010*). Par ailleurs, la dégradation de BST-2 par Vpu est un processus

relativement lent (la demi-vie de BST-2 d'environ 8h est diminuée d'environ 2 fois en présence de Vpu) (*Douglas JL et al., J Virol, 2009 ; Dube M et al., PLoS Pathog, 2010)* comparé à l'efficacité de dégradation de CD4 (demi-vie de CD4 d'environ 6h est diminuée d'environ 25 fois en présence de Vpu) (*Willey RL et al., J Virol, 1992*). Il y a donc un second mécanisme pour contrecarrer le facteur de restriction BST-2 distinct de celui de dégradation. Des résultats récents ont montré que Vpu n'augmente pas l'endocytose de BST-2 à la surface (*Mitchell RS et al., PLoS Pathog, 2009 ; Dube M et al., PLoS Pathog, 2010*) mais entraine sa relocalisation dans des compartiments périnucléaires correspondant au TGN. Ces résultats sont en accord avec les observation précédentes montrant que la localisation de Vpu dans le TGN est nécessaire à la libération des particules virales (*Dube M et al., J Virol, 2009*). Vpu semblerait également capable de contrecarrer la fonction BST-2 en le séquestrant dans des compartiments intracellulaire et en altérant son transport antérograde. De plus, les mutations des résidus lysine 18 et 21 dans la queue cytosolique de BST-2 abolissent totalement sa monoubiquitinylation (*Pardieu C et al., PLoS Pathog, 2010)* sans affecter la capacité de Vpu à diminuer son expression. Cela suggère que l'ubiquitinylation/dégradation et l'antagonisme de BST-2 soient deux fonctions séparées de Vpu. Comme Vpu est toujours capable de diminuer l'expression de surface du mutant Lys de BST-2, il semblerait que les fonctions d'ubiquitinylation/dégradation et la diminution de l'expression de surface de BST2 ne soient pas strictement liées lors de l'antagonisme induit par Vpu (*Goffinet C et al., J Virol, 2010* ; *Pardieu C et al., PLoS Pathog, 2010*). Ces résultats surprenants contrastent avec les data précédentes montrant que les mutants de Vpu incapable de lier β-TrCp (et par conséquent en théorie incapable d'ubiquitinyler et dégrader BST-2) comme le mutant de phosphorylation Vpu2.6, ont un antagonisme restreint sur la fonction de BST-2 (~50% du Vpu WT) (*Mitchell RS et al., PLoS Pathog, 2009 ; Dube M et al., PLoS Pathog, 2010 ; Mangeat B et al., PLoS Pathog, 2009 ; Douglas CC et al., Biochemistry, 2004)*. De la même manière, la déplétion de β-TrCp2 ou la surexpression d'un DN de β-TrCp, β-TrCpΔF, inhiberaient partiellement l'antagonisme de Vpu sur BST-2. Des résultats récents indiquant que β-TrCp est impliqué dans la polyubiquitinylation de résidus sérines et thréonines de la partie cytoplasmique de BST-2 et ayant un effet modeste sur la stabilité de BST-2 en présence de Vpu, peuvent apporter plusieurs indices quant au rôle de β-TrCp dans l'antagonisme de Vpu sur BST-2. Il est possible que la polyubiquitinylation de BST-2 induite par Vpu *via* β-TrCp peut augmenter la séquestration du facteur de restriction sans nécessairement conduire à sa dégradation (*Tokarev AA et al., J Virol, 2010*). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'antagonisme de Vpu sur la fonction antivirale de BST-2 précèderait et serait indépendant de la dégradation du facteur de restriction, mais résulterait plus de sa séquestration et la diminution de sa localisation aux sites de bourgeonnement viraux. (**Figure 30**).

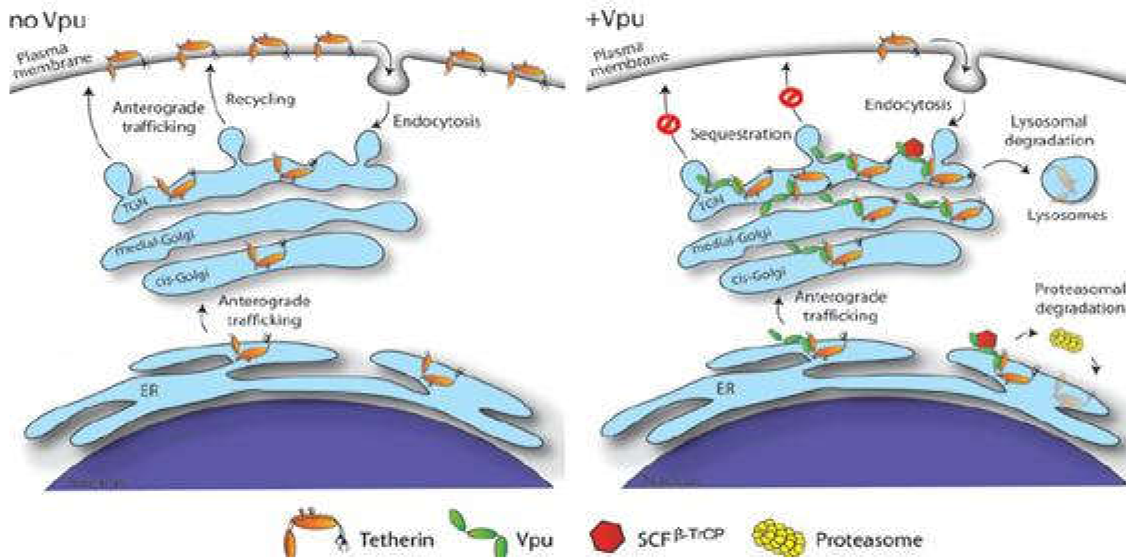


Figure 30: Modèles de l'antagonisme de BST-2 induit par Vpu.

De plus amples études doivent être menées afin d'évaluer le rôle de l'ubiquitinylation de BST-2 et sur sa dégradation dans les mécanismes par lesquels Vpu contrecarre la restriction imposée par BST-2 sur la libération de particules virales.